



**T.C.  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI  
ROMATOLOJİ BİLİM DALI**

**ROMATOİD ARTRİTLİ HASTALARDA ORAL SAĞLIK VE  
HASTALIK AKTİVİTESİ ARASINDAKİ İLİŞKİ**

**DR. MERYEM CAN  
ROMATOLOJİ YAN DAL UZMANLIK TEZİ**

**İSTANBUL- 2012**

**T.C.  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI  
ROMATOLOJİ BİLİM DALI**

**ROMATOİD ARTRİTLİ HASTALARDA ORAL SAĞLIK VE  
HASTALIK AKTİVİTESİ ARASINDAKİ İLİŞKİ**

**DR. MERYEM CAN  
ROMATOLOJİ YAN DAL UZMANLIK TEZİ**

**Tez Danışmanı:  
Doç. Dr. GÜZİDE NEVSUN İNANÇ**

**İSTANBUL- 2012**

Bu alışma, Marmara Üniversitesi Tıp Fakóltesi Bilimsel Araştırma Projeleri Destek Fonu tarafından desteklenmiş ve Marmara Üniversitesi Tıp Fakóltesi Etik Kurulu tarafından MAR-Y-2009-0295 protokol numarası ve B.30.2.MAR.0.01.02/AEK/479 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

## İÇİNDEKİLER:

	<b><u>Sayfa</u></b>
Önsöz.....	i
Özet .....	ii-iii
İngilizce özet .....	iv-v
1. Giriş ve Amaç .....	1-2
2. Genel Bilgiler.....	3-19
2.1. Romatoid artrit.....	3-11
2.1.1. Tanı ve sınıflama.....	3
2.1.2. Epidemiyoloji.....	4
2.1.3. Etyoloji.....	5
2.1.4. Patogenez .....	5-11
2.2. $\alpha$ -Enolaz.....	11-14
2.3. Kronik Periodontit.....	13
2.3.1. RA ve kronik periodontit arasındaki benzerlikler.....	14
2.3.2. Periodontal hastalık-RA ilişkisi.....	15-16
2.3.3. Enolaz-RA ilişkisi.....	16-18
2.4. Klinik bulgular.....	19
3. Materyal – Metod.....	19-21
3.1. Hasta-kontrol grupları .....	19
3.2. Verilerin toplanması.....	19
3.2.1. Venöz kan örneklerinin toplanması .....	20
3.2.2. Tükrük örneklerinin toplanması .....	20
3.3. Kan ve tükrük örneklerinin laboratuvar değerlendirmesi.....	20
3.4. İstatistiksel analiz.....	21
4. Sonuçlar.....	21-32
5. Tartışma.....	33-38
6. Referanslar.....	38-43

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Romatoloji Bilim Dalı'ndaki eğitimim süresince bilimsel ve kişisel açıdan yetişmemde emeği olan bölümümüzün tüm değerli öğretim üyelerine, tez çalışmamdaki katkılarından dolayı Doç. Dr. Gonca Mumcu'ya ve uzun öğrenim yaşantım boyunca her türlü sabır ve desteğini esirgemeyen sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Dr. Meryem Can

Haziran 2012

## ÖZET:

Romatoid artrit (RA) esas olarak eklemleri etkileyen kronik, sistemik inflamatuvar, otoimmün bir hastalıktır ve yetersiz tedavisi radyolojik hasara paralel olarak fonksiyonel kayıplara yol açabilmektedir. Son 10 yıl içerisinde yapılan çalışmalar RA'da birçok otoantijenin peptidyl arginine deaminaz (PAD) enzimi ile *peptidyl arginine*'den *peptidyl citruline*'e posttranslasyonel konversiyon ile dönüşen proteinler olduğunu göstermiştir. RA'lı hastalarda sitrüllinlenmiş proteinlere karşı tolerans kaybedilmiştir. Sitrüllinlenmiş proteinlere karşı antikorlar(ACPA), RA'da % 98 spesifisite ve yaklaşık % 80 sensitiviteye sahiptirler . Bu hastalarda hastalık daha ciddi ve erozif seyretmektedir. Ağız içinde bulunan anaerob bakterilere (P. Gingivalis, Treponema denticola, Tannerella forsythia) karşı antikorların ve bakteri DNA'larının RA'lı bireylerin serum ve sinovyal sıvılarında bulunduğu gösterilmiştir. Periodontit RA gelişiminde ve progresyonunda bir risk faktörü olarak görülmekte ve her iki hastalığın ortak bazı patogenetik mekanizmalara sahip olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmamızın amacı, RA'lı hastaların serum örneklerinde sitrüllinlenmemiş  $\alpha$ -enolaza karşı antikor, RF ve anti-CCP gibi belirteçleri çalışmak ve bunların oral sağlıkla ilişkisi değerlendirmektir. Bu amaçla serum örneklerinde RF, anti-CCP ve anti-enolaz antikor düzeyleri ölçülerek, sonuçların tükürük bakteri sonuçlarıyla ve hastalık aktivitesiyle ilişkisi araştırılmıştır.

Çalışmaya, 63 romatoid artrit hastası ve kontrol grubu olarak; 32 Behçet hastası ile 21 sağlıklı gönüllü dahil edilmiştir. Tüm RA hastalarının vizitleri yapılarak klinik ve laboratuvar parametreleri değerlendirilmiş, eş zamanlı olarak beraberinde venöz kan ve tükürük örnekleri alınmıştır.

Çalışmanın sonunda, grupların medyan serum anti-enolaz antikor düzeyleri arasında fark saptanmadı. Sağlıklı kontrol grubuna göre ROC Curve analizi yapıldığında serum enolaz için cut-off değeri 0.61 olarak bulundu. Bu cut-off değerine göre RA hastalarının %42.9'unda serum anti-enolaz antikor düzeyi pozitif

olarak saptandı. Serum anti-CCP, RF IgM ve RFIgA düzeyleri ise RA hastalarında kontrol gruplarına göre anlamlı oranda yüksek saptandı. Log P.Gingivalis ve Log TF değerleri üç grupta benzer saptandı. Serum anti-enolaz antikor düzeyleri ile logPG Ve logTF değerleri arasında herhangi bir ilişki saptanmadı.

Sonuç olarak, bu çalışmamızda RA' lı hastaların serumlarında bakılan anti-enolaz antikor düzeyi sağlıklı ve Behçet hastası grupları ile benzer bulunmuştur. Aynı şekilde oral bakteri düzeyleri (P.Gingivalis ve T. Forsthyia) de her üç grupta benzer olarak bulundu ve serum antikor düzeyleri ile bakteri sonuçları arasında bir ilişki saptamadık.

## **SUMMARY:**

Rheumatoid arthritis, is a systemic autoimmune and inflammatory disease, affecting mostly synovial joints and result in joint destruction, disability, and a reduced life expectancy. Over the last ten years, investigations have shown that an essential feature of many autoantigens in RA is the posttranslational conversion of peptidyl arginine to peptidyl citrulline. Anti-citrullinated protein antibodies(ACPAs) are highly specific(%98) and sensitive (up to%80) for RA, making citrullinated proteins strong candidates for driving the autoimmune response in this disease. ACPA positive patients present with a more severe and erosive form of arthritis. Antibodies to P.Gingivalis, Treponema denticola and Tannerella forsythia with bacterial DNAs were shown in serum and synovial fluid of RA patients. The pathophysiologic mechanisms of periodontitis are similar to those of RA and thought to that risk for development and progression of RA. The aim of our study was to determine serum levels of anti-enolase antibody, RF and anti-CCP antibody and its relationship with oral bacteria levels and disease activity. Sixty-three rheumatoid arthritis patients, 32 Behçet's disease patients and 22 healthy volunteers were included for the study. All patients were evaluated for clinical and laboratory parameters and venous blood and saliva samples were collected for all patients and controls. At end of the study, there were no difference found between groups for serum anti- enolase antibody level. After the Roc Curve analysis according to healthy subjects , serum anti-enolase antibody found %42.9 of patients with RA. Serum anti-CCP antibody , RF IgM and RF IgA antibodies were found significantly higher in RA patients. Saliva levels of P.Gingivalis and T. Forsythia were found similar in three groups and not associated with serum markers and disease activity.



## 1.GİRİŞ VE AMAÇ:

Romatoid artrit (RA) esas olarak eklemleri etkileyen kronik, sistemik inflamatuvar, otoimmün bir hastalıktır ve yetersiz tedavisi radyolojik hasara paralel olarak fonksiyonel kayıplara yol açabilmektedir (1,2). Diğer otoimmün romatizmal hastalıklardan farklı olarak RA'da sorumlu otoantijen bilinmemektedir. Romatoid faktörün RA hastalarında yüksek oranda (yaklaşık %80) bulunması dolayısıyla IgG'nin antijen olabileceği öne sürülmüş, ancak başka hastalıklarda ve sağlıklılarda da bulunabilmesi bu tezi zayıflatmıştır (3).

Son 10 yıl içerisinde yapılan çalışmalar RA'da birçok otoantijenin peptidyl arginine deaminaz (PAD) enzimi ile *peptidyl arginine*'den *peptidyl citruline*'e posttranslasyonel konversiyon ile dönüşen proteinler olduğunu göstermiştir. Porphyromonas gingivalis (PG), gram (-) periodontal bir bakteridir ve normal oral floranın bir parçası olarak endodontit, gingivitis ve periodontitten sorumludur (4). PG, RA için septik stimulan olarak görev yapmaktadır ve ayrıca PAD enzimini eksprese etmektedir. PAD sitrüllinasyonu sağlar; deri, kıl folikülleri ve miyelin kılıf dokularında sitrüllinasyon fizyolojik olarak gerçekleşmekte ve eklem gibi inflamasyon sahalarında da görülebilmektedir. PAD, RF içeren immün kompleks oluşumunu stimüle ederek lokal inflamasyona yol açar (5). RA'lı hastalarda sitrüllinlenmiş proteinlere karşı tolerans kaybedilmiştir. Sitrüllinlenmiş proteinlere karşı antikorlar (ACPA), RA'da % 98 spesifisite ve % 80 sensitiviteye sahiptirler. Bu hastalarda hastalık daha ciddi ve eroziv seyretmektedir (5). Enolaz (2-fosfo-D-gliserat hidrolaz) glikolizde görev alan bir enzimdir. Enolaz glukozdan pirüvat oluşumunda 2-fosfogliseratın fosfoenolpirüvata dönüşümünü katalize eder. İnsanlarda 3 farklı enolaz izoenzimi bulunur. Alfa enolaz (ENO1) hücrelerin sitoplazmalarında, beta enolaz (ENO3) kas dokusuyla ilişkili ve gamma enolaz (ENO2) nöron spesifiktir (6,7). Son zamanlarda sitrüllinlenmiş alfa enolaz RA'lı hastalarda potansiyel otoantijen olarak kabul edilmektedir. Alfa enolaza karşı antikorlar çeşitli otoimmün hastalıklarda (SLE, SS, PBS, otoimmün hepatit, IBD) gösterilmiştir (8). Alfa enolaz antikorlar erken RA'lı hastaların serumlarında % 25 oranında saptanmıştır. PG'e karşı oluşan antikor

titrelerinin serum anti-CCP düzeyleriyle korele olduğu gösterilmiştir (9,10). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada sitrüllinlenmiş alfa enolaz peptid 1 RA'lı hastalarda %37-62 oranında saptanmış ve bakteri kaynaklı enolazla arasında ilişki saptanmıştır (11). Periodontit ve RA arasında benzer patogenetik mekanizmalar gösterilmiştir. TNF- $\alpha$  ve IL-1 gibi proinflamatuvar sitokinler, doku matriks metalloproteinazları (MMP-9,-10) ve mikrobiyal enzimler her iki hastalıkta da önemli rollere sahiptirler (12,13). Ayrıca her iki hastalıkta ortak genetik ve çevresel epidemiyolojik risk faktörleri saptanmıştır (14,15). Birçok çalışmada RA'lı hastalarda periodontitin sağlıklı popülasyona göre daha sık olduğu gösterilmiştir. Yine RA'lı hastalarda periodontal enfeksiyonların hastalık aktivitesi yüksek ve anti-CCP pozitif hastalarda daha sık olduğu gösterilmiştir (14,15). Bu çalışmalara dayanarak periodontitin RA gelişimi ve progresyonunda bir risk faktörü olabileceği ileri sürülmüştür. Periodontit genel popülasyonda % 15-20 oranında gözükürken; RA % 0.5-1 oranında gözükmektedir (16). Kötü oral hijyen sonucu gingivada plak birikmekte ve bunun sonucunda periodontite zemin hazırlamaktadır. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, periodontitin cerrahi dışı tedavisiyle RA hastalık aktivitesinde azalma saptanmıştır (17). Yine başka bir çalışmada anti-TNF ajanlarla tedavinin periodontitli hastalarda hastalık şiddetini azalttığı gösterilmiştir (18). Bütün bunların sonucu olarak periodontit RA gelişiminde ve progresyonunda bir risk faktörü olarak görülmekte ve her iki hastalığın ortak bazı patogenetik mekanizmalara sahip olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmamızda RA'lı hastaların serum örneklerinde  $\alpha$ -enolaza karşı antikor, RF ve anti-CCP antikor çalışılmış ve bunların oral sağlıkla ilişkisi değerlendirilmiştir.

## **2.GENEL BİLGİLER**

### **2.1.Romatoid Artrit**

Romatoid artrit, inflamatuvar poliartritle karakterize, sistemik otoimmün bir hastalıktır. RA'nın en belirgin göstergesi özellikle el ve ayaklardaki küçük eklemlerin birçoğunda hassasiyet ve simetrik sinovyal effüzyondur. RA, hastalık seyri boyunca, %50'lere varan oranda iş gücü kaybına neden olabilmektedir (1,2)

#### **2.1.1.Tanı ve sınıflandırma**

RA'lı olguları sınıflandırmak için uzun yıllar 1987'de geliştirilen ACR (Amerikan Romatizma Birliği) kriterleri kullanılmıştır. Ancak, bu kriterler erozyonların geliştiği, geç dönemdeki, sıklıkla RF pozitif olguların RA tanısı ile sınıflandırılması için uygundur. Bu kriterlerle, RA'lı olguların erken tanınması ve erozyonların hızla geliştiği ilk aylar ve yıllarda, erken ve etkili tedavi edilmelerinde güçlükler olduğu ortaya koyulmuştur. RA'lı olguların, hastalık başlangıcında sınıflandırılabilmesi ve RA'da uygulanan güncel tedavi seçeneklerinden yararlanabilmeleri için, 2010 yılında, ACR ve Avrupa Romatizma Birliği'nin (EULAR) işbirliği ile yeni sınıflandırma kriterleri geliştirilmiştir (Tablo-1)(20).

**Tablo 1: 2010 ACR/EULAR Romatoid artrit sınıflandırma kriterleri**

Eklem tutulumu	1 büyük eklem	0
	2-10 büyük eklem	1
	1-3 küçük eklem	2
	4-10 küçük eklem	3
	>10 küçük eklem	5
Seroloji	RF ve anti CCP negatif	0
	RF ve anti CCP düşük pozitif	2
	RF ve anti CCP yüksek pozitif	3
Akut faz reaktanları	ESH ve CRP normal	0
	ESH veya CRP yüksek	1
Semptom süresi	< 6 hafta	0
	≥6 hafta	1
<b><u>Skor ≥6 RA tanısı için anlamlıdır.</u></b>		

### **2.1.2. Epidemiyoloji**

RA insidans ve prevalansı popülasyonlara göre farklılık göstermekte, bu da genetik predispozisyonun ve çevresel faktörlerin önemli rol oynadığını düşündürmektedir.

Romatoid artrit'in yıllık insidansı yaklaşık olarak erkeklerde 1000'de 0,2, kadınlarda 1000'de 0,4'dür. Epidemiyolojik veriler, RA'nın sık (%0,5-1) bir hastalık olduğunu ortaya koymuştur (2). Türkiye'de yaşa ve cinsiyete göre uyarlanmış RA prevalansı % 0,36 olarak bildirilmiştir.

### **2.1.3. Etiyoloji**

RA'nın etiolojisinde çeşitli faktörlerin rolü vardır. Romatoid artrit genetik yatkınlık zemininde, çevresel faktörlerin tetikleyici etkisiyle ortaya çıkabilmektedir. RA'lı olguların monozygot ikizlerinde %15-30, dizigot ikizlerinde %5 RA gelişme riski, genetiğin katkısını ortaya koymaktadır (1,2).

RA ile ilişkili otoantikörlerin (RF, anti CCP) varlığı ile ilişkili olarak, farklı yatkınlık genlerinin rolü üzerinde durulmaktadır. HLA-DRB1 lokusunda sık bir aminoasit dizimi olan QKRAA, QRAA, RRRRAA (ortak epitop) varlığı, RF veya CCP pozitif olgularda, RA gelişimi için bilinen bir risk faktörüdür. ACPA pozitif RA'da, hücre içi sinyal yolları (NFκB yolağında TRAF-1 gibi) ve T hücre uyarılmasını tetikleyen risk allelleri (PTPN22, CTLA-4 gibi) gösterilmiştir. Otoantikör saptanmayan olgularda, interferon düzenleyici (IRF-5) ve lektin bağlayıcı proteinler gibi farklı HLA risk allelleri bildirilmiştir. Çevresel faktörlerin (sigara ve inhaler silikon maruziyeti) HLA-DRB1 alleli taşıyan ve ACPA pozitif olgularda ön plana çıkması da bu sınıflandırmayı desteklemektedir (1,2,21).

İnfeksiyonlar (Ebstein-Barr virüsü, sitomegalovirus, proteus, E.Coli, P.Gingivalis) da patogeneze katkıda bulunmaktadır. RA'nın kadınlar arasındaki belirginliği hormonal ve üreme ile ilgili faktörlerin etkisine işaret etmektedir. Doğurganlık, emzirme ve ekzojen hormon kullanımı hastalığa yatkınlığı belirleme ile ilişkili olarak düşünülmüştür. İlişkili olduğu düşünülen çevresel ve yaşam tarzı faktörleri obezite, diyetsel antioksidan maruziyeti, sigara içimi, kahve tüketimi ve belirli spesifik meslek maruziyetlerini içermektedir (1,2).

### **2.1.4. Patogenez**

Romatoid artrit, tek bir teori ile açıklanması mümkün olmayan oldukça karışık bir patogeneze sahiptir. Klinik ve patolojik bulgulardan sorumlu beş ana mekanizma olduğu düşünülmektedir.

- 1.Genetik yatkınlık
- 2.Otoantikörler
- 3.Hücrel immun yanıt
- 4.Hormonlar
- 5.Çevre-genetik ilişkisi

#### **2.1.4.1. Genetik Faktörler**

RA gelişiminde hereditenin etkisi yaklaşık %60'tır; bu da, hastalık riskinin büyük oranından genetik faktörlerin sorumlu olduğunu göstermektedir. Popülasyonlar arasındaki tutarsızlıklara rağmen ortak epitop hipotezi, RA gelişme riski ve şiddetine HLA'nın etkisi konusundaki bilgilerimize hala önemli oranda katkıda bulunmaktadır. Major histokompatibilite kompleksi immunoregülatuar genler ile sıkı bir şekilde paketlenmiştir. Bu da non-HLA-DRB1 genlerinin RA gelişim riski ve şiddetinde önemli olabileceğine yönelik kanıtları ortaya çıkarmaktadır. PTPN22 R620W allellinin RA ile en sık tekrar edilebilen bir genetik içinde olduğu saptanmıştır. Ayrıca STAT4, TNFAIP3/OLIG3 ve TRAF-1 C5 bölgelerini kodlayan genlerdeki polimorfizmler ACPA pozitif hastalarda risk faktörü olarak gösterilmiştir. Ortak epitop ve polimorfizmlere zıt olarak DERA aminoasit allelini taşıyanların RA geliştirme riski düşüktür. DERA pozitifliği % 16 oranında gözükür (1,2,21-22).

#### **2.1.4.2. Hücresel immün yanıt**

Romatoid sinovitte, T ve B lenfositler hücreler, nötrofiller, monositler ve mast hücreleri bulunur. Bu hücreler inflammatuar sitokinleri ve kemokinleri salgılar. Vasküler büyüme faktörleri de neovaskülarizasyonu sağlayarak patogeneze katkıda bulunurlar. Sitokin aktivasyonu sonucu sinovyal fibroblastlar ve osteoklastlar aktive olur; bunun sonunda da kıkırdak ve kemik yıkımı gelişir. Özellikle T lenfositleri içeren hücre aracılı immün yanıtlar, hem HLA-DR ile birliktelikleri, hem de sinovyumda T hücrelerin varlığı ve özellikleri, RA patogenezinde güçlü bir şekilde rol alırlar. RA'da kritik immün yanıtın otoantijenlere veya eksojen antijenlere (örn., bakteriler) karşı olup olmadığı henüz kesin değildir. Artritin deneysel modelleri, eklemde eksprese edilenler kadar; her yerde rastlanan self-antijenlerin de bulunduğunu gösterir; bunlar eklem inflammasyonunun sürdürülmesinden sorumlu olabilirler. Sinovyal T hücreleri hafıza hücreleri için güçlendirilir ve eklemde toparlanmalarını yansıtan oldukça farklılaşmış bir durumda korunurlar ve lokal çevredeki faktörler apoptozisi inhibe ederler.

Proinflammatuar IL-17 üretilir ve bu, kıkırdak ve kemik yıkımını etkileyebilir. RA sinovyumunda TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-15, IL-18 gibi sitokinler baskındır. Sinovyal makrofajlarla üretimleri antijen-spesifik T hücreleri ya da sitokinler veya diğer

reseptörler(örn., KIR) ile aktivasyonu takiben, antijen- bağımsız bir etki ile T hücreleri tarafından yapılabilir. Sinovyal T hücreleri popülasyonu, regülator T hücrelerini de içerir; bunlar, pro-inflamatuar T hücre aracılı yanıtları sonlandırırlar. Birbirleri ile ilişkiye giren bu hücreler, değişik proinflamatuar sitokinleri salgılayarak sinovyal proliferasyona ve sinovite neden olmaktadır. Kıkırdak ve kemik harabiyetine yol açan bu sitokinlerden en önemlileri, interlökin 1 $\beta$  , IL12, interferon  $\gamma$  ve tümör nekroz faktörü  $\alpha$ 'dır. Nitekim, bu günlerde tedaviye giren anti-sitokin ajanların da esas hedefleri proinflamatuar T helper 1 yanıtını engellemeye dayanmaktadır.

Hümmoral sistem aktivasyonunun kanıtları ise sinovyumda romatoid faktörün bulunması, immün komplekslerin oluşumu ve kompleman aktivasyonudur. Ayrıca B lenfosit yüzey antijeni olan CD 20 ye karşı geliştirilmiş otoantikörlerin RA tedavisinde başarılı bulunması da B lenfositlerin hastalık patogenezindeki rolüne işaret etmektedir (1-2,22-23).

#### **2.1.4.3. Otoantikörler**

Otoimmünite, sinovyal sıvı ve kanda otoreaktif T hücrelerinin ve otoantikörlerin varolduğu RA'nın ayırt edici özelliklerinden biridir. RA'da 1940 yılında Eric Waaler tarafından tanımlanan ilk otoantikör romatoid faktördür (RF); daha sonra IgG'nin Fc parçasının antijenik determinantına bağlı otoantikör ailesinden biri olarak tanımlandı. Bu gözlem, RA'nın patogenetik özelliğinin temelini oluşturmuştur. Bu temel, diğer otoimmün hastalıklar gibi RA'nın sonraki tanımlanmasını, klas 2 MHC allelleri ile anlamlı ilişkisini desteklemiş, paylaşılmış epitoplarla, özellikle HLA-DRB1 geninin üçüncü çok-değişken (hipervariable) bölgesindeki kısa ucu ile anlamlı ilişkisinin gösterilmesine yardımcı olmuştur.

RF, IgG'nin tüm dört alt sınıfı ile ilişkili olabilir, fakat RA'lı hastaların kan lenfositlerinden salgılanan RF'nin özellikle IgG1 ve IgG2 ile anlamlı ilişkili olduğu görülmektedir. IgM-RF, RF'nin major cinsidir; fakat IgG-RF IgA-RF de RA'lı hastaların serum ve sinovyal sıvılarında bulunabilmektedirler. IgM-RF sentezi, immün kompleksler ve poliklonal B hücre aktivatörleri, örneğin, bakteriyel lipopolisakkaridler veya EBV tarafından artırılabilir. IgM RF geçici sentezi sekonder immün yanıtla beraberdir ve immünoregülatuar sürecin bir parçasıdır. RF bakteriyel ve viral infeksiyonlar süresince, muhtemelen immün kompleks içeren mikrobiyal antijenlere yanıt olarak salgılanır. Poliklonal stimülasyon sağlıklı insanlarda bulunabilen polireaktif düşük-affiniteli IgM'yi uyarır. RA'da, RF'nin ayırıcı özelliği, uzun

yıllar devamlı olmasıdır. Bu RA'lı hastalarda serumda ve sinoviyal sıvıda immün komplekslerin devamlı varlığıyla ilişkili olabilir.

Yerleşmiş hastalığın tanımlandığı RA'lı hastaların %60-80'inde IgM RF tespit edilmektedir, fakat erken RA'lı hastalarda daha düşük sıklıktadır. RA'dan farklı olarak IgM RF primer Sjögren sendromlu veya mikst kriyoglobulinemili hastaların çoğunda yüksek titrelerde bulunur ve diğer romatizmal otoimmün hastalıklarda ve hatta osteoartritte de düşük titrelerde bulunabilir. Bundan başka subakut bakteriyel endokardit, hepatit, tüberküloz veya lepra gibi enfeksiyöz durumlarda da oluşabilir. IgM-RF'nin spesifitesi yüksek titrelerde oldukça artmaktadır, fakat yüksek-titreli RF sadece kesin tanı konulmuş hastaların %50-60'ında vardır ve genellikle erken RA'lı hastaların %50'sinden azında bulunmaktadır. RF'nin tüm altgrupları hastalığın erken evrelerinde bulunabilir ve hatta hastalığın başlangıcından birkaç yıl öncesinde oluşabilirler.

Birçok çalışma RA için IgA-RF'nin, IgM-RF ve IgG-RF subtiplerinden daha spesifik olduğunu belirtmektedir. Önemli olarak, RF yüksek titrelerinin, özellikle IgA RF'nin belirgin prognostik değeri vardır, çünkü bunlar RA'nın şiddeti ile (örn; radyolojik erozyonlar, daha hızlı hastalık progresyonu, romatoid nodul, vaskülit gibi eklem-dışı belirtiler) ilişkilidirler.

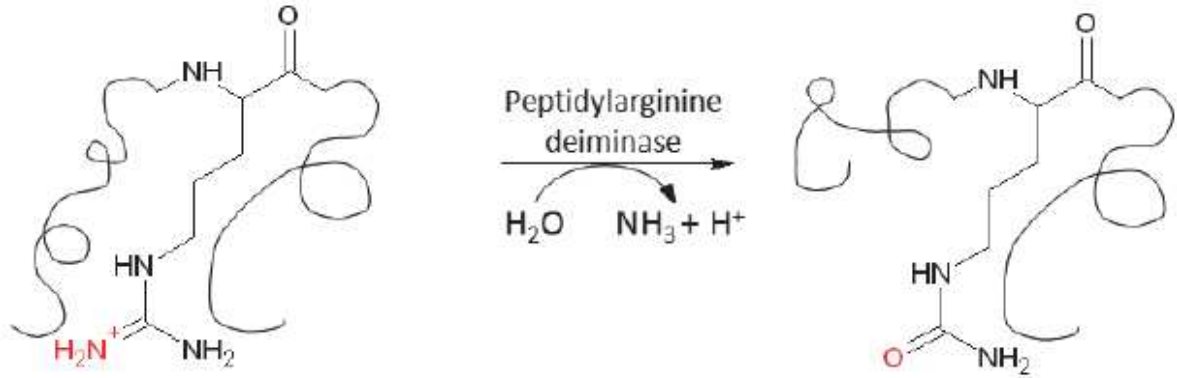
RF, immün komplekslerin istekliliğini belirlemede fizyolojik bir role sahiptir; bu suretle immün kompleks klirensini düzeltir. Bundan başka RF taşıyan B hücreleri antijen sunan hücreler gibi hareket edebilir ve immün kompleksler üzerinden T hücrelerine yeterli derecede antijen sunarlar. Eklemdeki immün kompleksler ile IgG içeren immün kompleksler ile kompleman fiksasyonu, IgM-RF bağlanması ile sağlanır. Bu durum, kıkırdak antijenlerine ve eklemde sentezlenen diğer proteinlere ve eklem spesifik olmayan stres proteinlerine ve bazı nukleer proteinlere karşı antikor içeren immün kompleksler için kısmen önemli olabilmektedir. RA'lı hastaların sinovyal dokularında kompleman komponentleri sentezlendiğinden, kompleman-aracılı yollar da hastalığın kronikliğine ve aktivitesine katkı yapmaktadırlar (1-2,21-23).

Anti-sitrullin antikorlar RA'da nispeten daha erken ortaya çıkarlar ve hastalık için yüksek oranda özgüldürler (% 98). Birçok farklı laboratuvar tarafından yapılan bir seri çalışmada bu antikorların hedefinin, memeli deri ve özefagus epitel hücrelerinin terminal diferansiyasyonunun ileri safhalarında eksprese edilen bir protein olan fillagrin olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu antikorların posttranslasyonel olarak değiştirilmiş veya sitrulline edilmiş



filagrini hedef aldıkları da bulunmuştur (24-26). Posttranslasyonel sitrulinasyon işlemi belirli polipeptidlerdeki argininlerin deiminasyonunu içerir ve  $Ca^{++}$  bağımlı peptidilarginin deiminaz (PAD) enzimi tarafından katalize edilir ( Figür 1)(27). PAD1, PAD2, PAD3, PAD4, PAD6 gibi beş farklı isotip tanımlanmıştır (Tablo 2). PAD2 ve PAD4 RA'lı hastaların sinovyal zarlarında, sinovyal sıvı hücrelerinde ve sinovyal sıvıda gösterilmiştir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, 20 RA'lı, 20 SpA'lı ve 20 OA'lı hastanın eklem sıvıları incelendiğinde, hepsinde PAD4 ekspresyonu gözlenirken, sadece RA'lı hastalarda PAD2 ekspresyonu gözlemiştir (28). Bu biyokimyasal işlem sonucu, pozitif yüklü argininler polar ama yüksüz sitrulinlere dönüşür. Sitruline edilmiş peptidlerin yapılarındaki bu değişimler bunları RA'daki IgG antikorlarının hedefi haline getirir. Arginin içeren bu peptidler değişen özellikleri sayesinde, ortak epitopu (SE) eksprese eden MHC Sınıf II moleküllerindeki P4 olarak bilinen pozitif yüklü peptid-bağlayıcı pakete 100 kat fazla afinite ile bağlanabilirler (ör; HLA- DRB1\* 0101, 0401 ve 0404). RA için koruyucu olan HLA-DRB1\*0402 aleli, arginin ve muhtemelen sitruline bağlanabilen negatif yüklü bir P4 bağlayıcı pakete sahiptir. Bu kompleks için yüksek afinitesi olan T hücreleri bu nedenle periferik lenfoid dokularda eksprese edilmezler. Bu da HLA-DRB1\*0402 aleli olan hastaların neden RA kliniği geliştirmedeğini açıklayabilir. DR4-IE transgenik fareler, sitruline edilmiş peptidlerle duyarlılaştırıldığında, RA'daki bağışık yanıtın önemli bir bölümünü teşkil ettiği düşünülen CD4 Th1 yanıtları üretmişlerdir. Bu gözlemler, sitruline edilmiş peptidlere karşı oluşan bağışık yanıtın SE'yi kodlayan MHC Sınıf II genleri tarafından yönlendirildiğini vurgulamaktadır. Bu bulgular, RA'lı hastalarda yapılan ve anti-sitrulin antikorları ile SE arasında güçlü bir ilişki olduğunu gösteren diğer çalışmalarla uyumludur. Bu bulguların RA patogenezi ile bağlantısı nedir sorusu gündeme gelebilir. Birçok deneysel gözlem, sitruline karşı oluşan bağışık yanıtların RA inflamasyonunun patogenezinde önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir (1,2,21,26). Öncelikle, RA'lı hastaların sinovyal dokusunda sitruline edilmiş proteinlerin (fibrinojenin sitruline edilmiş alfa ve beta zincirleri ve sitruline edilmiş vimentin) bulunduğu gösterilmiştir. Sitruline edilmiş proteinlerin, RA hastalarının derin sinovyal dokularındaki interstisyel birikimlerde ve sinovyadaki monosit/makrofaj benzeri hücrelerin sitoplazmalarında bulunduğu düşünülmektedir. Benzer şekilde bazı deneysel artrit modellerinde sitruline edilmiş proteinler sinovyal dokuda bulunabilir, ki bu durum inflamasyonun bu işlemi belki de PAD aktivitesini artırarak düzenlediğini düşündürmektedir. Uygun bir konakta (ör; SE eksprese eden bir kişi) bu sitruline edilmiş proteinler, eklemdeki

yerel immün yanıtın hedefi olabilirler. SE için transgenik olan farelere sitruline edilmiş fibrinojenin verilmesi ile RA'ya benzeyen artrit indüklenebileceği gösterilmiştir. Transgenik olmayan farelerde veya sitruline edilmemiş ve değiştirilmemiş fibrinojen verilen farelerde ise artrit indüklenememiştir. Sitruline edilmiş proteinler inflamasyonlu sinovyal dokuda üretildiklerinden, bu antijenler immün sistem tarafından hedef görülerek kronik inatçı sinovite neden olabilecek inflamatuvar işlemleri başlatabilirler (1-4).



Figür 1: PAD reaksiyonu ( 27 no'lu referanstan alınmıştır)

Olgun filagrinin APF ve AKA antikorlarının hedefi olduğu bilgisine dayanarak, sentetik sitrulin içeren peptidler geliştirilmiş ve RA serumu ile etkileşimleri test edilmiştir. Enzim bağlı immunosorban tekniği (ELISA) ile filagrin dizilerinden elde edilen sitrulin içeren bir peptid kullanılarak, RA'lı hasta serumlarının yaklaşık %48'inde % 98 spesifite ile antikorlar saptanmıştır. Yalnızca sitrulin içeren peptidler reaktif olup sitrulinin başka bir aminoasit ile değiştirildiği peptidler pek aktif bulunmamıştır; bu durum sitrulin grubunun APF ve AKA tarafından tanınan antijenik determinant olduğuna işaret etmektedir.

Şimdiye kadar RA'lı hastaların eklem sıvılarında 4 tane sitruline antigen tanımlanmıştır: sitrulinated fibrinojen/fibrin, vimentin, kollajen tip 2 ve  $\alpha$ -enolase (1-4,21,23-26). Anti-Sa antikorları, başlangıçta insan dalak ve plasenta parçalarında bulunan 50kDa'lık fonksiyonu ve yapısı bilinmeyen bir proteine karşı yönetilmiş bir antikor olarak rapor edilmiştir. Intermediate filaman proteini vimentin üzerindeki sitrülline epitoplara tanıdıkları ve böylece ACPA'nın diğer alt grubunu oluşturdukları gösterilmiştir. Anti-Sa antikorları RA hastalarında yaklaşık % 40 oranında gözükür. Bu antikorlar erken RA'lı hastalarda %20 oranında bulunurlar ve yüksek prognostik değere sahiptir (1-4).

Kollajen 2 eklemdaki major kollajendir ve ayrıca major kollajen otoantijenidir. Antikorlar kollajen 2'nin hem doğal, hem de denatüre formlarına karşı oluşabilirler ve birçok patolojik durumda mevcuttur. RA'da antikollajen 2 antikorlarının prevalansı %30-70 olarak bildirilmiştir ve erken hastalık döneminde yüksek gibi gözükmektedir. Çoğu çalışmada, kollajen tip 2 otoimmunitesi ile RA şiddeti, aktivitesi ve hastalığın süresi arasında belirgin bir ilişki bulunmamıştır. Bu nedenle ve belirgin bir spesifitelerinin olmaması sonucu anti-kollajen antikorlar yararlı diagnostik belirteçler olarak düşünülmemektedir (1-4).

Tablo 2: PAD enziminin yerleri ve görevleri (27 no'lu referanstan alınmıştır).

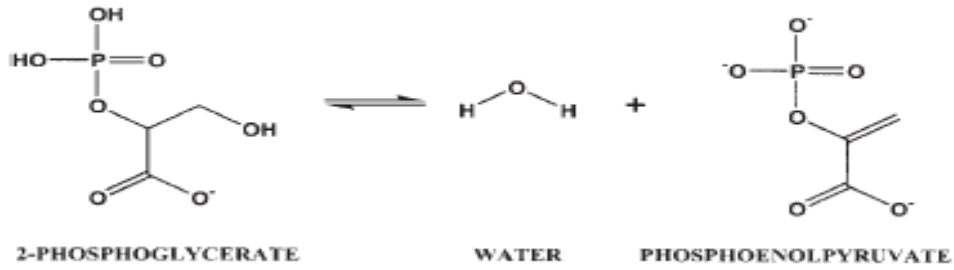
	Localization	Function
PAD1	Epidermis, hair follicles, arrector pili muscles, and sweat glands	Citrullination of filaggrin and keratin, facilitating proteolysis and crosslinking of the proteins and contributing to skin cornification. Maintains hydration of stratum corneum and epidermis barrier function. Differentiation of hair follicles.
PAD2	Brain astrocytes, sweat glands, arrector pili muscles, skeletal muscle, spleen, macrophages, monocytes, epidermis, synovial tissue, and synovial fluid	Citrullination of myelin basic protein in the brain and spinal cord, promoting electrical insulation of myelin sheaths. Citrullination of vimentin in apoptotic monocytes and macrophages.
PAD3	Upper layers of epidermis and hair follicles	Citrullination of trichohyalin, contributing to directional hair growth.
PAD4	Hematopoietic cells and inflamed rheumatoid synovium	Citrullination of transcriptional coactivator p300 and histones H2A, H3, and H4, regulating gene expression by chromatin remodelling. Citrullination of fibrin, contributing to chronic inflammation in rheumatoid arthritis. P53-dependent citrullination of proteins following DNA damage, translocation of histone chaperone nucleophosmin, and p53-mediated inhibition of tumor cell growth.
PAD6	Ovary and testis tissue and peripheral blood leukocytes	Amino acids known to be conserved in PAD enzymatic activity are not conserved in PAD6. Function and enzymatic activity remain unclear.

PAD, peptidylarginine deiminase.

## 2.2. $\alpha$ -ENOLAZ

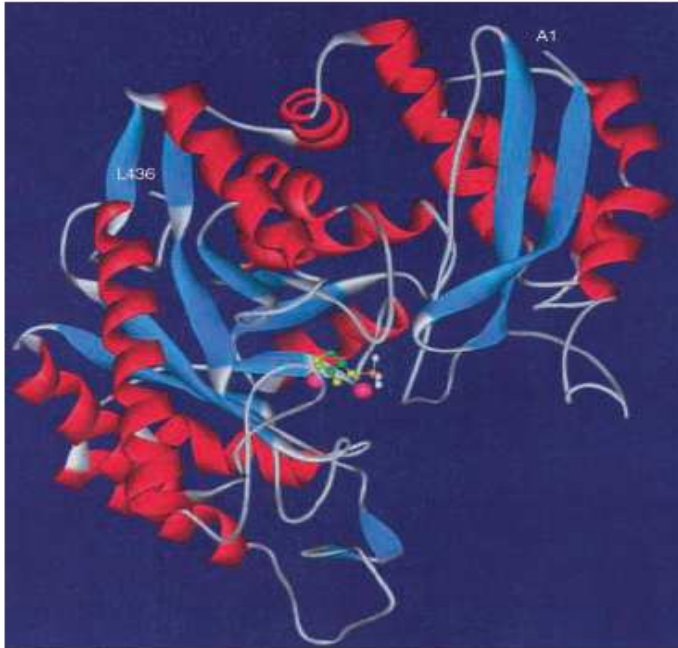
Enolaz ( 2-fosfo-D-gliserat-hidrolaz) 1934'de Lohman ve Mayerhof tarafından bulunmuştur. Enolaz (2-fosfo-D-gliserat hidrolaz) glikolizde görev alan bir enzimdir. Enolaz glukozdan pirüvat oluşumunda 2-fosfogliseratın fosfoenolpirüvata dönüşümünü katalize eder (Şekil 2). İnsanlarda 3 farklı enolaz izoenzimi bulunur. Alfa enolaz (ENO1) hücrelerin

sitoplazmalarında, beta enolaz (ENO3) kas dokusuyla ilişkili ve gamma enolaz (ENO2) nöron spesifiktir.



Şekil 2: Enolaz reaksiyonu (6 no'lu referanstan alınmıştır)

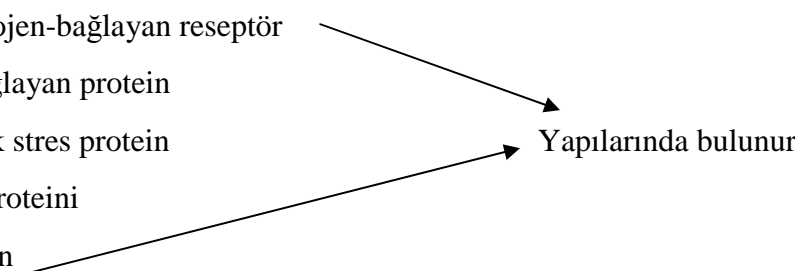
Enolaz 82000-100.000 Da ağırlığında 2 subunitten oluşur. Aktifleşmesi için magnezyum, mangan, çinko, nikel ve kobalt gibi metal iyonlara gereksinimi vardır. Bunların içinde magnezyum en güçlü olarak bağlanır,sırasıyla;  $Mg^{2+} > Zn^{2+} > Mn^{2+} > Fe^{2+} > Cd^{2+} > Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Sm^{3+}$ ,  $Tb^{3+}$  (Şekil 3).



Şekil 3: Maya enolazının kristal yapısı-şerit diagram (6 no'lu referanstan alınmıştır)

Glikoliz veya fermantasyon yapan tüm doku ve organizmalarda bulunmaktadır. Enolaz insan kas ve kan hücreleri gibi çeşitli kaynaklardan izole edilebilir. Enolaz farklı hücre yerleşimlerinde, çok yönlü, karmaşık bir protein olarak tanımlanmıştır. Son çalışmalar göstermiştir ki, çoğu patojenik türün farklı hücre tiplerinin hücre duvarlarında, hücre zarlarında ve hücre nükleusunda bulunmaktadır.

#### **Enolazın fonksiyonları:**

- Plasminojen-bağlayan reseptör
  - Myc-bağlayan protein
  - Hipoksik stres protein
  - Isı şok proteini
  - Crystallin
  - Çeşitli mikrobiyal hastalıklarda rol alır ( Grup AStreptokok, Candida Albicans, Strep. Mutans) ve Kanser oluşumu
  - Otoimmünite (Anti-sentrozom antikor, ANCA-ilişkili vaskülit, nefrit, Ülseratif kolit, Crohn hastalığı, bilier siroz, otoimmüne hepatit, SLE) (6-10)
- Yapılarında bulunur
- 

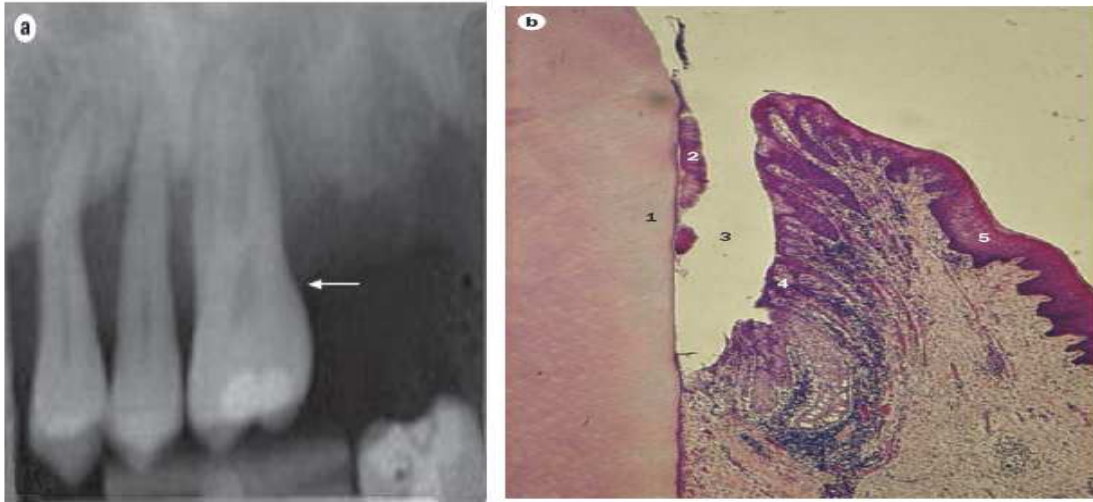
### **2.3. Kronik Periodontit**

Kronik periodontit (KP), dental biyofilm tarafından başlatılan enflamasyona bağlı olarak meydana gelen bağ doku ataşmanı ve alveol kemik kaybı ile karakterize, kronik enfeksiyöz bir hastalıktır (Şekil 4) (29). Periodontal dokulardaki enflamatuar hücre birikimine makrofajlar ve plazma hücreleri hakimdir. Konağa ait faktörler hastalığın ilerlemesinde belirleyici rol oynar. Bir bireyde meydana gelen periodontal doku yıkımının miktarı; sigara, stres, yerel hazırlayıcı faktörler ve sistemik risk faktörleri tarafından belirlenir. KP daha çok erişkinlerde olmakla birlikte gençlerde de görülebilen bir hastalıktır.

KP, geleneksel anlamda bir bakteri enfeksiyonu olmayıp dental biyofilm içindeki mikroorganizmalara karşı gelişen konak immün yanıtının tetiklediği inflamatuvar bir hastalıktır. Genetik, sigara ve sistemik hastalıklar gibi çeşitli risk faktörleri, hastalığın şiddet ve ilerleme hızının belirlenmesinde bakterilerden daha etkin rol alırlar. Mikrobiyal saldırıdan kaynaklı antijenler ve diğer virülans faktörleri konağın savunma mekanizmalarını harekete geçirir. Konak yanıtına bağlı olarak sitokinler, prostaglandinler, kompleman ürünleri ve

matriks metalloproteinazları açığa çıkar. Bu medyatörler, kemik ve bağ dokusunda yıkım meydana gelmesinin yanı sıra konak yanıtının devamlılığında rol oynarlar.

Periodontal hastalığın ateroskleroz, koroner kalp hastalığı, miyokard infarktüsü de içeren çeşitli sistemik hastalıklarla ilişkili olduğu saptanmıştır. Aynı zamanda, diyabetin komplikasyonlarından biri olabileceği de ileri sürülmüştür. Bu sistemik hastalıkların içinde RA kemik ve yumuşak dokuda KP'ye benzer tarzda harabiyetin görüldüğü kronik inflammatuar bir hastalık olması nedeniyle ilgi odağı olmuştur (14-17). Mercado ve ark. nın yaptığı bir çalışmada RA hastalarında KP görülme sıklığının genel toplumdaki %1'lik orana göre 4 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir. Hücreler, sitokinler ve enzimler gibi doku hasarının derecesini belirleyen patolojik süreçler RA ve periodontit de benzerlik gösterir (Şekil 4). Her iki hastalıkta da benzer patolojik mekanizmalar etkili olduğu halde RA tedavisinde kullanılan antiinflammatuar ilaçların maskeleyici etkileri klinik olarak iki hastalık arasında ilişki saptanmasını güçleştirmektedir (30).



Şekil 4: KP'de kemik kaybı ve inflamasyon (29 no'lu referanstan alınmıştır.)

### **2.3.1. Romatoid artrit ve Kronik Periodontit arasındaki benzerlikler**

Sitokinler, her iki hastalığın patogenezinde tartışmasız rol oynamaktadır. RA'da olduğu gibi KP'de de IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$  gibi proinflammatuar sitokinlerin seviyesi artarken, immuno-inflammatuar yanıtı baskılayan IL-10 ve TGF- $\beta$  seviyeleri düşer. Her iki hastalıkta da hücreler arası matriksin yıkımı MMP'ler ile inhibitörleri arasındaki dengeye bağlıdır. Kemik

oluşumu ve yıkımı normalde bir arada ama denge halinde ilerleyen süreçler olmalarına karşın hem RA, hem de KP'de bu iki süreç arasındaki dengenin bozulması sonucu kemik yıkımı meydana gelmektedir. P.gingivalis tarafından uyarılan dendritik hücreler lenfosit aktivasyonunu sağlar ve böylece B- hücrelerinin devamlılığı sağlar. Gingival dokuda B hücreleri T hücrelerinden fazladır. Gingival epitelyal hücrelerde B hücre maturasyonuna katkı sağlar. KP durumunda plazma hücreleri gingival hücrelerinin %50'sini oluşturur (14-17,29-31).

### **2.3.2. Periodontal hastalık-Romatoid artrit ilişkisi**

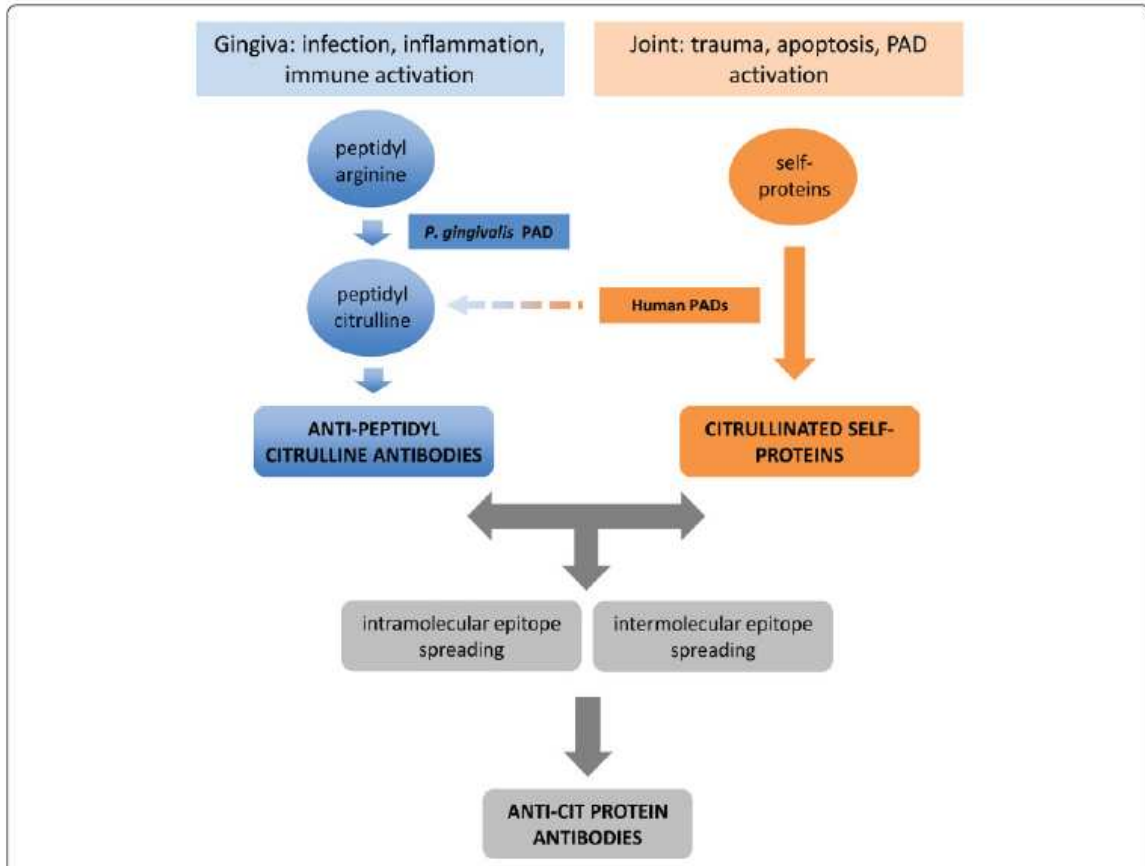
Birçok çalışmada RA ve KP ilişkisi gösterilmiştir. RA periodontitli bireylerde, ya da tersi olarak KP RA'lı bireylerde toplumdaki sıklıklarından daha fazla oranda görülmektedir. Bir çalışmada RA'lı hastalarda sağlıklı insanlara göre yaş, cinsiyet, sigara ve etnik kökenden bağımsız olarak KP daha fazla saptanmıştır. Her iki hastalıkta da genetik faktörler etyolojiye %50 oranında katkıda bulunur. HLADRB1 (ortak epitop), PTPN22 -620W polimorfizmi, non-reseptör PTPN22, sigara kullanımı gibi iyi tanımlanmış risk faktörleri sitriline antijenler karşı antikor yanıtı olan hasta alt gruplarında özellikle tanımlanmıştır (30-32).

Ağız içinde bulunan anaerob bakterilere (PG, Treponema denticola, Tannerella forsythia) karşı antikorların ve bakteri DNA'larının RA'lı bireylerin serum ve sinovyal sıvılarında bulunduğu gösterilmiş ve RA'lı hastaların sinovyal sıvılarında bazı periodontal patojenlere karşı gelişen özgün antikorların (IgA, IgG) yüksek seviyelerde olmasının RA etyopatogenezinde önemli rol oynayabileceği öne sürülmüştür (33). PG, RA'da rolü olduğu bilinen PAD enzimini üretebilen tek bakteri olma özelliğini taşımaktadır. Periodontal enfeksiyonu olan bireyler PAD tarafından uyarılan antijenlere maruz kalmaktadırlar (Şekil 5)(34).

PAD, RF'de içeren immün komplekslerin oluşumunu içerir. Mikuls ve ark. RA tanısı konmuş hastalarla (n=78), sistemik olarak sağlıklı fakat periodontal hastalığı olan bireyler (n=39) ve hem sistemik hem de periodontal olarak sağlıklı bireyle (n=40) olmak üzere üç grupta PG'ye karşı antikor titrelerini ve PG seropozitif olan (+) RA'lı hastalarda CRP, anti-CCP ve RF seviyeleri ile PG titreleri arasındaki ilişkiyi değerlendirmişlerdir. RA'lı hastalarda PG'in belirgin olarak arttığını ve PG'ye bağlı enfeksiyon ile anti-CCP ve CRP arasında ilişki olduğunu bildirmişlerdir (34).

*P.melaninogenica* ve *P.intermedia*'nın ısı şok proteinlerine (HSP70) karşı oluşan antikorlar RA hastalarının sinovyal dokuları ile periodontal dokularında yüksek seviyelerde bulunmuş ve ayrıca, bazı stres uyarıcı faktörlerle HSP70 ekspresyonu artırıldığında bu hastaların sinovyumundaki inflamatuvar sitokinlerin de arttığı gösterilmiştir (35-36).

Şekil 5: PG- tarafından indüklenen sitrülizasyon(34 no'lu referanstan alınmıştır.)

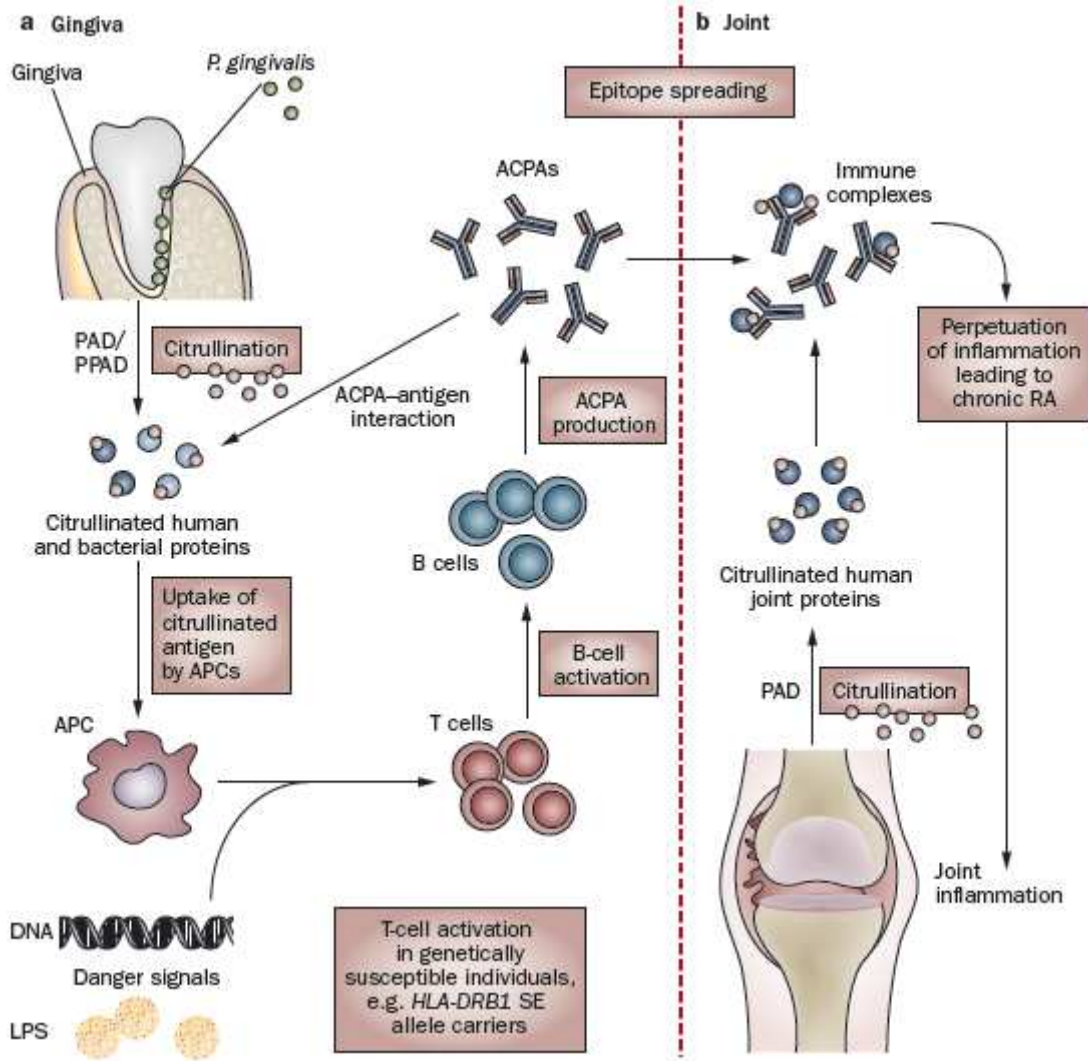


### 2.3.3. Enolaz-RA ilişkisi

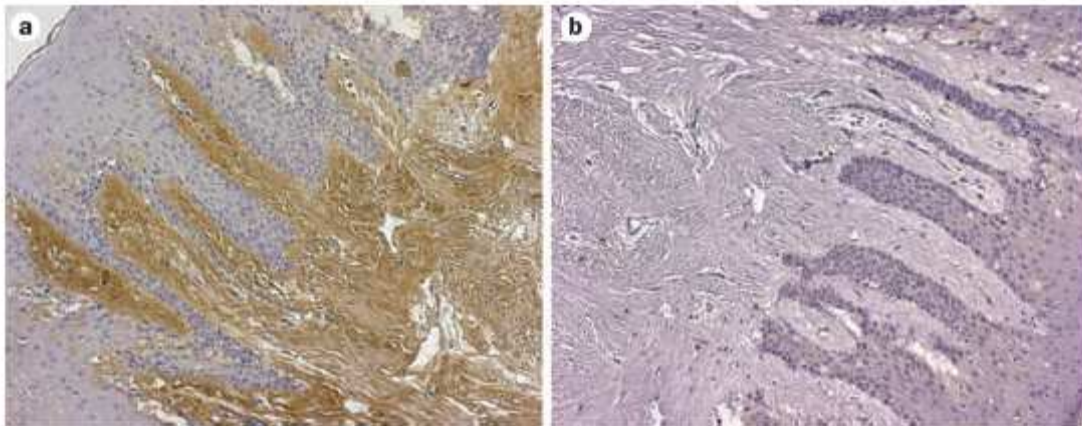
İlk defa Kinloch ve ark. tarafından sitrülline  $\alpha$ -enolaz RA'da aday otoantijen olarak tanımlanmıştır (9-10). Daha sonra aynı grup, 102 RA'lı hasta, 92 sağlıklı kontrolle yaptıkları çalışmada, sitrüllinlenmiş  $\alpha$ -enolaz peptid-1'i RA'lı hastalarda %37-62 oranında saptamış ve



bakteri kaynaklı enolazla arasında korelasyon gözlemişlerdir (11). Şimdiye kadar yaklaşık 3.000 serum örneğinde yapılan çalışmalarda, anti-CEP1 sıklığı yaklaşık %40 oranında saptanmıştır ve %97 oranında özgüllüğe sahiptir (37). İnsan  $\alpha$ -enolaz ile bakteriyel enolaz % 51 oranında aynı yapıya sahiptir ve CEP-1 bölgesinde bu yapının % 82 oranına çıktığı gözlenmiştir (Şekil 6)(11). Anti-CCP pozitif hastaların yaklaşık yarısında sitriline enolaz-peptit 1'e karşı antikor gösterilmiştir. 1000 RA ve 872 sağlıklı da yapılan başka bir çalışmada genetik risk faktörlerinin (HLADRB1, PTPN22 -620W polimorfizmi, non-reseptör PTPN22, sigara kullanımı) anti-CEP1 varlığıyla anti-CCP'ye göre daha ilişkili olduğu bulunmuştur (OR: 39.0 vs 4.3, CEP-1+ /CCP+ , CEP-/CCP+) (37). PG'e karşı oluşan anti-CEP1 antikor insan CEP-1 peptidile ilişkili bulunmuştur. Anti-CCP antikorlar RA klinik bulgularından yıllar önce hasta serumlarında saptanabilir (38-39). 15 hastayı kapsayan pre-RA serumlarının 9'unda anti-CEP1 antikorlar saptanmıştır (9). IgA CCP ve IgA CEP1 varlığı da mukozal yüzeylerin, (örn. gingiva) olaya katkısını yansıtmaktadır. Periodontitli hastaların gingival doku biyopsilerinde sitriline proteinler gösterilmiştir (Şekil 7).



Şekil 6: RA'da PG ve Enolaz ilişkisi (34no'lu referanstan alınmıştır)



Şekil 6: Gingivadaki sitrülline proteinler (38 no'lu referanstan alınmıştır)

## **2.5. Klinik bulgular**

Hastaların büyük çoğunluğunda (yaklaşık %70) bir kaç haftaya yayılmış sinsi bir başlangıç söz konusudur. Bu süre içerisinde hafif bir ateşin de eşlik ettiği halsizlik, yorgunluk, kilo kaybı ve bir veya bir kaç küçük eklemde ağrı vardır. Eklem ağrısı dışında hastaların önemli bir yakınması, uyku veya uzun süren bir istirahat sonrası, eklemler ve eklemlerin çevrelerinde oluşan ve sabah tutukluğu olarak tanımlanan sertlik hissidir. Sabah tutukluğu, hekime, eklem ağrısının iltihabi karakterde olduğunu anlatan çok önemli bir bulgudur. Aktif hastalıkta günün geç saatlerine kadar devam edebilir. Klinik, başta el ve ayak eklemleri olmak üzere bir çok eklemde simetrik şişliklerin gelişmesi ile tamamlanır (1-2).

## **3.MATERYAL-METOD:**

Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Romatoloji Bilim Dalı'nda Kasım 2010-Nisan 2012 tarihleri arasında gerçekleştirilmiş, prospektif, vaka-kontrol çalışması olup, çalışma protokolü Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulu tarafından onaylanmıştır.

### **3.1.Hasta- kontrol grupları**

Çalışmaya 1987 ACR kriterlerine göre RA tanısı almış 63 romatoid artrit hastası dahil edilmiştir (tablo1). Hasta kontrol grubu olarak Uluslararası Çalışma Grubu Kriterlerine (UÇGK) göre Behçet hastalığı tanısı ile izlenmekte olan 32 hasta (40), sağlıklı kontrol grubu olarak 21 sağlıklı gönüllü seçilmiştir. Çalışmaya katılan tüm hastaların ve sağlıklı gönüllülerin “bilgilendirilmiş onam formu” alınmıştır. Çalışmaya dahil edilmeme kriteri olarak 18 yaş altı olmak ve aktif enfeksiyon ve kanser öyküsü olması alınmıştır.

### **3.2 Verilerin toplanması**

Tüm RA hastalarının vizitleri yapılarak klinik ve laboratuvar parametreleri değerlendirilmiş, eş zamanlı olarak beraberinde venöz kan ve tükürük örnekleri alınmıştır.

### **3.2.1. Venöz kan örneklerinin toplanması**

Kan örnekleri alınmış, örnekler aynı gün oda ısısında, 1500 rpm hızında, 5 dakika santrifüj edilerek -80 C de saklanmıştır.

### **3.2.2. Tükrük örneklerinin toplanması**

Tüm grupların tükrük örnekleri sabah en az 8 saat açlık sonrası alınmıştır. Örnekler çalışma sonuna kadar -80 C de saklanmıştır.

### **3.3. Kan ve tükrük örneklerinin laboratuvar değerlendirmesi**

Çalışma süresince toplanan kan örneklerinde, ELISA yöntemi ile anti-CCP, RF IgM, RF IgA ve anti-enolaz antikor ölçümleri yapılmıştır.

#### **3.3.1 Tükrük örneklerinin değerlendirilmesi ve bakteri analizleri**

Bakteriyel strain ve kültür : Porphyromonas gingivalis ATCC 33277T, anaerobik olarak Columbia kanlı agarda 37°C 'de 3-4 büyütüldükten sonra 2-3 günde 37°C'de BHI'da bekletildi. Tannerella forsythia (T. Forsythia) sıvı kültürden sağlandı. Genelute Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich,UK) kullanılarak bakterilerin DNA'ları izole edildi. DNA konsantrasyonları Nanodrop spektrofotometre ile ölçüldü. Tükrük örnekleri çözündükten sonra 1000µl örnek ayrılarak yerine aynı miktarda PBS eklendi. 15 dakika 10000 devirde santrifüj edildi. Santrifüjden bakteriyel genomik DNA izole edildi. DNA tanımlanması PCR'la yapıldı. Bakterilerin (T. forsythia, P. Gingivalis) kantitatif değerlendirmesi yapılırken her bir bakteri için ölçülen bakteri genomik DNA değerlerinin logaritması hesaplanarak analizlerde kullanılmışlardır (LogTF, Log PG).

#### **3.3.2. Serum örneklerinin değerlendirilmesi**

Çalışma süresince toplanan kan örneklerinde, ELISA yöntemi ile anti-CCP (Medipan, GMBH), RF IgA (Generics Assays,GMBH), RF IgM (Generics Assays,GMBH) ve anti-enolaz antikor (USCN, Life Science) ölçümleri yapılmıştır. Anti-CCP <30 U/ml negatif,

$\geq 30$  IU/ml pozitif olarak değerlendirildi. RF IgM  $< 10$  IU/ml negatif,  $> 15$  IU/ml pozitif olarak kabul edildi. 10-15 IU/ml arası değerler *gray zone* olarak değerlendirilmiştir. RF Ig A  $< 25$  IU/ml negatif ve  $> 30$  IU/ml pozitif olarak değerlendirildi. 25-30 IU/ml arası değerler *gray zone* olarak değerlendirilmiştir. Anti-enolaz antikoru 0,312-20 ng/ml değer aralığında ölçüldü. Sağlıklı değerlerinden cut-off belirlendi.

## **İstatistik**

Sürekli değişkenlerin normal dağılmaması nedeniyle, medyanlar arasındaki karşılaştırmalar, non-parametrik Kruskal- Wallis ve Mann- Whitney U testleri kullanılarak yapılmıştır. Anlamlı farklılık tanımlaması için  $p < 0.05$  değeri alınmıştır. Üç grup karşılaştırması yapılması nedeniyle tip 1 hata olasılığını ortadan kaldırmak için post-hoc analizlerde p değerinin anlamlılık sınırı  $p < 0.01$  olarak azaltılmıştır. Klinik bulgularla ELISA sonuçlarının karşılaştırılmasında kullanılan bağıntı analizi için Spearman korelasyon testi uygulanmıştır.

## **4. SONUÇLAR**

### **4.1. Hasta-kontrol gruplarının genel özellikleri**

Çalışmaya 63 RA, 32 Behçet hastası (BH) ve 21 sağlıklı gönüllü kontrol grubu (SK) olarak alındı. RA hastalarının ortalama yaşları BH ve SK gruplarına göre daha yüksek saptandı [sırasıyla 50.7(11.6), 38.7(10.4) ve 39.8(10.6) yıl] ( $p=0.001$ ). RA hastalarının ortalama hastalık süresi 7.0 (1-30) yıldır ve Behçet grubuyla arasında fark saptanmadı [7(1-25) yıl] ( $p=0.2$ ). Tablo 1’de RA hastalarının demografik ve klinik özellikleri özetlenmiştir. Hastaların % 74.6’sı ( $n=47$ ) kadın hastalardı ve hastaların %19’u sigara kullanıyordu. Ekstra-artiküler tutulum (sekonder Sjögren sendromu, pulmoner nodül, subkutan romatoid nodül vb.) %11.1 ( $n=7$ ) hastada mevcuttu. Hastaların mean(SD) DAS 28 (ESH) skorları 4.6 (1.63) olarak hesaplandı. Medyan hassas ve şiş eklem sayıları (28 eklem) sırasıyla, 4.0 (0-28) ve 4.0 (0-23) olarak bulundu. Hastalar Stanford Sağlık Değerlendirme Ölçeği(HAQ,SDÖ) ile değerlendirildiğinde medyan skor 0.80 (0-2) olarak bulundu. Hasta ve doktor global VAS

skorları sırasıyla 60 (0-100) ve 50 (0-80) olarak bulundu. Ağrı VAS skoru medyan değeri ise 60(0-100) olarak hesaplandı.

Behçet hastalarının hepsinde (%100) oral aft saptandı. Genital ülser 29 (%90,6), paterji pozitifliği 17 (%53.1), eklem tutulumu 15 (%46.9), follikülit 14 (%43.8), eritema nodozum 16 (%50) ve üveit ise 3 (%9.4) hastada saptandı. Sadece 2 hastada aile hikayesi vardı ve sadece 2 hasta sigara kullanıyordu. Hastaların hepsi kolsişin (ortalama doz 1,5 gr/gün) kullanıyordu. 2 hasta predizolon (5 mg/gün), 4 (%12.5) hasta sulfasalazin (2gr/gün) ve 3 (%9.4) hasta metotreksat (15mg/hafta) kullanıyordu. Hastalar semptom şiddet skoruyla değerlendirildiklerinde medyan şiddet skoru 3.97(2-7) olarak bulundu. Behçet grubunda LogTF, Log PG, serum anti-enolaz antikoru ve anti-CCP antikor düzeyleri ve semptom şiddet skoru arasında bir korelasyon saptanmadı.

**Tablo 1:** RA hastalarının demografik ve klinik özellikleri

	<b>RA hastaları</b>
<b>Yaş (yıl), mean(SD)</b>	50.7(11.6)
<b>Cinsiyet (K/E)</b>	47/16
<b>Hastalık tipi (n)</b>	
DMARD naif	25
Anti-TNF naif	13
DMARD	25
<b>Hastalık süresi (yıl)</b>	7(1-30)
<b>Sigara kullanımı, n(%)</b>	12(19)
<b>Ekstraartiküler tutulum, n(%)</b>	7(11.1)
<b>HAQ skoru (0-3)</b>	0.8(0-2)
<b>Hasta Global VAS skoru(0-100)</b>	60(0-100)
<b>Doktor Global VAS skoru(0-100)</b>	50(0-80)
<b>Ağrı VAS skoru(0-100)</b>	60(0-100)
<b>HES(28 eklem)</b>	4( 0-28)
<b>ŞES(28 eklem)</b>	4(0-23)
<b>CRP(mg/lt)</b>	5.8(0.4-89.9)
<b>ESH(mm/saat)</b>	29(3-90)
<b>Tedavi</b>	
Metotreksat (n)	29
Salazoprin(n)	19
Leflunomid(n)	7
Hidroksiklorokin(n)	16
Prednizolon(<10 mg/gün)(n)	27

#### **4.2. RA, BH ve SK gruplarının serum otoantikor düzeyleri**

Grupların medyan serum anti-enolaz antikor düzeyleri arasında fark saptanmadı [SK, RA ve BH sırasıyla 0.68 (0.4-9.5), 0.47 (0.06-20) ve 0.67 (0.41-1.52) ] ( $p>0.05$ ). Sağlıklı kontrol grubuna göre ROC Curve analizi yapıldığında serum anti-enolaz antikorunun için cut-off değeri 0.61 olarak bulundu. Bu cut-off değerine göre RA hastalarının %42.9 (n=27)'unda serum

anti-enolaz antikor düzeyi pozitif olarak saptandı. Serum anti-CCP, RF IgM ve RF IgA düzeyleri RA grubunda diğer iki gruba göre anlamlı oranda yüksek saptandı (Tablo 2). Serum RF IgM antikor titresi RA hastalarında %69.8 oranında pozitif saptanırken, BH'da %3.1 ve SK grubunda %9.5 oranında pozitiflik gözlemlendi. Benzer şekilde serum RF IgA antikor düzeyi RA hastalarında %68.7 oranında pozitif saptanırken BH grubunda % 15.6 ve SK grubunda %9.5 oranında pozitif saptandı. Sağlıklı grupta anti-CCP pozitif hasta yoktu ve BH grubunda 1 hastada pozitiflik saptandı. RA hastalarında %73 oranında anti-CCP pozitifliği gözlemlendi.

**Tablo 2:** Grupların serum otoantikor düzeyleri

	RA, n(%)	BH, n(%)	SK, n(%)	p"
<b>RF IgM, IU/ml</b>	44(69.8)	1(3.1)	2(9.5)	0.001
<b>RF IgA, IU/ml</b>	37(68.7)	5(15.6)	2(9.5)	0.001
<b>Anti-CCP, U/ml</b>	46(73)	1(3.1)	0(0)	0.001

" Gruplar arası karşılaştırmalar non parametrik Kruskal-wallis ve Mann-Witney U testi ile yapıldı. BH grubuyla SK grubu arasında fark saptanmadı.

#### 4.3. Grupların bakteriyel analiz sonuçları

Oral bakteri analizleri P. Gingivalis (PG) ve T. Forsthyia (TF) kantitatif değerlerinin logaritmik (log) değerleri hesaplanarak analiz edildi. LogPG için üç grup arasında bakteri değerleri açısından bir fark saptanmadı [medyan(min-max)= 4.4 (1.6-7.3), 4.3 (1.11-6.7) ve 5.01 (2.1-6.1), sırasıyla RA, BH ve SK gruplarında] (p=0.2). LogTF sonuçları da her üç grupta benzer saptandı [medyan(min-max)= 5.05 (0.8-9.07), 4.6 (1.6-6.4) ve 4.7 (3.5-5.6) sırasıyla RA, BH ve SK gruplarında] (p=0.5)(Tablo3).



**Tablo3:** Grupların bakteri analiz sonuçları

	<b>RA(n=63)</b>	<b>BH(n=32)</b>	<b>SK(n=21)</b>	<b>P</b>
<b>LogPG</b>				
<b>Mean(SD)</b>	4.35(1.4)	4.07(1.5)	4.7(1.1)	
<b>Medyan(min-max)</b>	4.4(1.6-7.3)	4.3(1.11-6.7)	5.01(2.1-6.1)	0.2
<b>Log TF</b>				
<b>Mean(SD)</b>	4.6(1.5)	4.5(1.1)	4.7(0.4)	
<b>Medyan(min-max)</b>	5.05(0.8-9.07)	4.6(1.6-6.4)	4.7(3,5-5.6)	0.5

Sağlıklı kontrol grubuna göre ROC curve analizi yapıldığında Log P.Gingivalis için cut-off değeri 4.48 ve Log T.Forsthyia için cut-off değeri 5.34 olarak hesapladı. Belirlenen cut-off değerini aşan hasta oranları karşılaştırıldığında hasta grupları arasında fark saptanmadı (Tablo 4).

**Tablo 4:** Grupların LogPG ve LogTF cut-off değerlerine göre pozitiflik oranları

	<b>RA(n=63)</b>	<b>BH(n=32)</b>	<b>SK(n=21)</b>	<b>P</b>
<b>LogTF, n(%)</b>	24(38.1)	8(25)	3(14.3)	0.09
<b>LogPG, n(%)</b>	31(49.2)	15(46.9)	14(66.7)	0.3

" ki-kare testi

#### **4.4. RA hastalarının hastalık aktivitesine göre sonuçları**

RA hastalarının %39.7'si daha önce tedavi almayan ve yeni tanı konan hastalar, %20.6'sı DMARD tedavisi altında aktif seyreden ve anti-TNF $\alpha$  başlanması planlanan hastalardan oluşurken %39.7'si DMARD tedavisi altında olan hastalardı. Bu üç grup analiz edildiğinde LogTF, LogPG ve serum anti- enolaz antikor ve anti-CCP antikor pozitiflik düzeyleri arasında fark saptanmadı (Tablo 5).

*Tablo 5: RA hastalarının subgrup analiz sonuçları*

	<b>DMARD-naif (n=25)</b>	<b>TNF-naif(n=13)</b>	<b>DMARD (n=25)</b>	<b>P</b>
<b>LogPG, Mean(SD) Median(min- max)</b>	4.05(1.2) 3.9(1.6-6.4)	4.31(1.62) 5.01(1.64-6.43)	4.6(1.51) 4.8(1.71-7.36)	0.3
<b>LogTF Mean(SD) Median(min- max)</b>	4.6(1.6) 5.05(1.7-9.07)	4.70(1.09) 5.21(2.28-6.09)	4.5(1.56) 5.01(0.8-6.4)	0.9
<b>Serum anti- enolaz antikor Mean(SD) Median(min- max)</b>	1.00(0.34) 0.34(0.09-8.97)	0.6(0.5) 0.5(0.06-1.71)	1.9(4.2) 0.4(0,1-20)	0.7
<b>Serum anti- enolaz antikor pozifliği, n(%)</b>	14(44)	6(46.2)	10(40)	0.9
<b>Serum anti- CCP antikor pozitifliği, n(%)</b>	17(68)	12(92.3)	17(68)	0.2

RA hastaları DAS28(ESH) düzeylerine göre analiz edildiğinde düşük, orta ve yüksek hastalık aktivitesine göre gruplar arasında Log PG, LogTF, serum anti-enolaz antikor düzeyleri açısından fark saptanmadı (Tablo 6).

Serum anti-CCP antikor düzeyleri ile logPG, logTF değerleri arasında herhangi bir ilişki saptanmazken CRP ile pozitif yönde korelasyon saptandı ( $p=0.03$ ,  $r=0.2$ ). Diğer hastalık aktivite belirteçleri ile korelasyon saptanmadı.

Serum anti-enolaz antikor düzeyleri ile logPG, logTF değerleri arasında herhangi bir ilişki saptanmadı. Aynı şekilde anti-enolaz antikor düzeyleri ile şiş eklem sayısı, hassas eklem sayısı, CRP, ESH, ekstraartiküler hastalık varlığı ve sigara kullanımı arasında da korelasyon bulunmazken, HAQ değeri ile negatif yönde korelasyon saptandı. ( $p=0.01$ ,  $r= -0.30$ ).

LogPG düzeyi ile CRP arasında negatif yönde korelasyon saptanırken ( $p=0.02$ ,  $r= -0.28$ ), ekstraartiküler tutulumla da pozitif yönde korelasyon saptandı ( $p=0.03$ ,  $r= 0.27$ ). LogTF değerleri ile klinik parametreler arasında korelasyon saptanmadı.

**Tablo 6: Hastalık aktivitesine göre sonuçlar**

	<b>DAS28 (&lt;3.2)</b>	<b>DAS28 (&gt;3.2&lt;5.1)</b>	<b>DAS28 (&gt;5.1)</b>	<b>P</b>
<b>LogPG</b>				
<b>mean(SD)</b>	5.08(1.4)	4.1(1.4)	4.1(1.4)	
<b>median(min-max)</b>	5.39(1.7-7.3)	4.3(1.6-6.6)	3.8(1.6-6.4)	0.12
<b>LogTF</b>				
<b>mean(SD)</b>	4.8(1.4)	4.5(1.7)	4.5(1.25)	
<b>median(min-max)</b>	5.5(0.8-6.08)	5.01(1.4-9.0)	4.9(1.7-6.2)	0.42
<b>Serum anti-enolaz antikor</b>				
<b>mean(SD)</b>	1.3(2.4)	2.1(4.4)	0.5(0.5)	
<b>median(min-max)</b>	0.5(0.1-9.3)	0.5(0.1-20)	0.2(0.06-1.7)	0.08
<b>Serum anti-CCP pozitifliği, n(%)</b>	10(76.9)	11(47.8)	25(92.6)	0.02*
<b>Serum anti-enolaz pozitifliği, n(%)</b>	6(46.2)	11(47.8)	10(37)	0.2

\* DAS28 (<3.2) ve DAS28 (>5.1) olan gruplar arasında

#### 4.5. RA hastalarının Anti-CCP ve anti-enolaz antikor durumlarına göre analizi

Anti-CCP %73 (n=46) RA hastasında pozitif saptanırken, %27 (n=17) hastada negatif saptandı. RA hastaları CCP(+) ve CCP (-) durumlarına göre analiz edildiğinde; medyan Log PG ve LogTF değerleri arasında fark saptanmadı [4.5 (1.6-7.3) vs 4.3 (1.6-6.6) ve 5.09 (0.83-6.21) vs 4.9 (1.4-9.0), CCP(+) ve CCP(-), sırasıyla, p=0.7, p=0.9]. Aynı şekilde grupların medyan serum anti-enolaz antikor değerleri arasında da fark saptanmadı [0.3 (0.06- 9.38) ve 0.5 (0.13-20), CCP(+) ve CCP(-), sırasıyla, p= 0.4]. Serum anti-enolaz antikor pozitifliği anti-CCP(+) grupta %41.3 saptanırken, anti-CCP(-) grupta %47.1 oranında saptandı (p=0.7) (Tablo7).

**Tablo 7:** RA hastalarının anti- CCP (+) ve anti-CCP(-) durumuna göre karşılaştırılması

	anti-CCP(+) (n=46)	anti-CCP(-) (n=17)	p
<b>Serum anti-enolaz antikor ( ng/ml), median(min-max)</b>	0.3(0.06-9.58)	0.5(0.13-20)	0.4
<b>Log TF, median(min-max)</b>	5.09(0.83-6.21)	4.9(1.4-9.0)	0.9
<b>Log PG, median(min-max)</b>	4.5(1.6-7.3)	4.3(1.6-6.6)	0.7
<b>Serum anti-enolaz pozitifliği, n(%)</b>	19(41.3)	8(47.1)	0.7

RA hasta grubu ileri analiz yapabilmek için anti-CCP antikoru ve anti-enolaz antikoru pozitiflik ve negatiflik durumlarına göre 4 ayrı subgrupta incelendi. Buna göre %14.3 (n=9) hasta her iki antikor için de seronegatif (CCP-/enolaz-). %46.0 (n=29) hasta anti-CCP

pozitifken anti-enolaz antikoru negatif (CCP+/enolaz-). Sadece 8 (%12.7) hasta anti-enolaz antikoru pozitifken, anti-CCP için seronegatifti (enolaz+/CCP-). %27 (n=17) hasta hem anti-CCP, hem de anti-enolaz antikoru taşıyordu (enolaz+/CCP+). Bu dört subgrup arasında analiz yapıldığında sadece CCP-/ enolaz - ile CCP+/ enolaz - grupları arasında DAS28, ESH ve CRP arasında istatistiksel fark saptandı (p=0.04, p=0.05, p=0.02) (Tablo 8). enolaz +/CCP+ grupları diğer grupları arasında bir fark saptanmadı.

**Tablo 8: RA subgrup analizi**

	<b>enolaz - /CCP- (n=9)</b>	<b>enolaz - /CCP+ (n=29)</b>	<b>enolaz + /CCP- (n=8)</b>	<b>enolaz +/- CCP+ (n=17)</b>
<b>LogTF</b>	4.5(1.45- 9.07)	5.1(1.8- 6.2)	5.2(2-6.4)	5.0(0.8-6.03)
<b>LogPG</b>	4.2(1.6- 5.7)	4.4(1.6- 7.3)	4.6(2.4- 6.6)	4.6(1.7-6.43)
<b>DAS28(ESH)</b>	3.8(2.1- 6.2)	5.3(1.5- 8.2)	4.3(1.4- 6.5)	4.2(2.1-7.2)
<b>CRP( mg/lt),</b>	3.3(0.4- 33.4)	8.7(0.8- 89.9)	4.0(0.5- 37.2)	5.8(0.7-39.5)
<b>ESH(mm/saat)</b>	15(3-90)	32(9- 76)	35(8-55)	20(6-74)
<b>YAŞ(yıl)</b>	59(35- 72)	47(20- 72)	53(36-71)	52(26-67)
<b>HAQ skoru</b>	0.8(0-2)	1.1(0- 2)	0.7(0-1)	0.5(0-2)
<b>Hastalık süresi(yıl)</b>	7.0(1- 16)	6(1-30)	6.5(2-15)	8(1-28)



## 5.TARTIŞMA:

Sitrülline proteinlere karşı oluşan antikolar, RA için tanısal anlamda spesifiktirler ve klinik hastalıktan yıllar önce hasta serumlarında tespit edilebilirler. Bu proteinler argininin posttranslosyonel modifikasyonu sonucu oluşmaktadır. Bu işlem peptidyl arginin deaminaz (PAD) enzimi ile gerçekleşmektedir (23-26). Kronik periodontit etkeni olan P. Gingivalis, RA'da rolü olduğu bilinen PAD enzimini üretebilen tek bakteri olma özelliği taşımaktadır (3-4).

Periodontal enfeksiyonu olan bireyler PAD tarafından oluşturulan sitrülline protein antijenlerine maruz kalmaktadırlar. Yalnızca sitrulin içeren peptidler reaktif olurken sitrulinin başka bir aminoasit ile değiştirildiği peptidler pek aktif bulunmamıştır; bu durum sitrulin grubunun APF ve AKA tarafından tanınan antijenik determinant olduğuna işaret etmektedir. Şimdiye kadar RA'lı hastaların eklem sıvılarında 4 tane sitrülline antijen tanımlanmıştır: sitrulinlenmiş fibrinojen/fibrin, vimentin, kollajen tip 2 ve  $\alpha$ -enolase (3-4,37-39).

Biz bu çalışmamızda periodontal enfeksiyonun önemli etkenleri olan P.gingivalis ve T.Forsythensis isimli mikroorganizmaların RA hastalarımızın oral florasında belirlediğimiz kantitatif değerleri ile otoantikor ve hastalık aktivite ilişkilerini araştırdık. Sitrülinlenmiş proteinlerin RA hastaları için olan spesifitelerini değerlendirmek amaçlı olarak nonsitrülline  $\alpha$ -enolase'a karşı oluşan otoantikor düzeyleri RA, BH ve SK gruplarında incelenmiştir.

RA, anti-CCP durumuna göre iki gruba bölünmektedir: CCP(+) ve CCP(-). Bu antikor, RA için spesifik olarak tanımlanmıştır ve anti-CCP pozitif hastaların %40-60'ında pozitif saptanmıştır (1-2). Yeni EULAR/ACR RA klasifikasyon kriterlerinde bu antikoların ölçüldüğü anti-CCP testi yer almaktadır. Bizim çalışmamızda anti- CCP pozitifliği % 73 olarak bulundu ve CCP (+) hastaların % 41.3'ünde anti-enolaz antikor düzeyi pozitif saptandı ki bu sonuçlar literatürle uyumlu olarak bulundu. Bu antikoların varlığı eklem sıvısında da gösterildi. Anti-CCP antikor, ortak epitop taşıyan ve sigara içen bireylerde yüksek oranda saptanmıştır. Bizim çalışmamızın çoğunluğunu kadın hastalar oluşturuyordu ve sigara içme oranı %19 olarak saptandı. Sigara kullanımıyla da anti-CCP pozitifliği arasında herhangi bir ilişki saptamadık. 291 RA ve 100 sağlıklı bireyde İsveç'ten yapılan bir çalışmada; anti-CCP antikor %70 oranında pozitif saptanırken, sitrülline fibrinojene karşı antikor %66 ve

sitrülinlenmiş enolaza karşı antikor %41 hasta serumunda saptanmıştır (38). Bu çalışmanın sonucu bizim çalışmamızla benzer saptanmakla beraber bizim hasta sayımız ve sağlıklı kontrol sayımız daha azdı. Yine bu çalışmada, bu antikorların çoğunluğu CCP(+) grupta tespit edilmiştir. Aynı çalışmada anti-CCP ve sitriline otoantijenlere karşı antikorlar HLAB1\*04 ile ilişkili bulunmuştur. Bizim çalışmamız genetik analiz içermiyordu.

$\alpha$ -enolaz ilk defa erken RA'lı hastaların %25'inde aday otoantijen olarak tanımlanmıştır (9). Daha sonra P.Venables ve ark., RA'lı 50 hasta ve 40 sağlıklı kontrolde sitriline anti-enolaz ve non-sitriline anti-enolaz antikor çalışmışlar ve sitriline anti enolaz antikoru %46 oranında saptarken, nonsitriline anti-enolaz antikoru %13 oranında gözlemişlerdir (10). Kontrol grubunda her iki antikor da %15 oranında pozitif saptanmıştır. Bizim çalışmamızda nonsitriline enolaza karşı antikor %42.9 oranında saptandı.  $\alpha$ -enolaz sinovyal membranda çok sayıda bulunmakta ve RA'da sitriline formuna karşı antikor yüksek oranda diğer otoimmün hastalıklardan farklı olarak saptanmaktadır. Aynı şekilde sinovyal sıvıda da enolaz antikoru tespit edilmiştir (28,41). Anti-enolaz antikoru çalışmamızda literatürle uyumlu olarak SK ve BH gruplarında da sırasıyla %71.4 ve %68.8 oranlarında saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda spesifik bir otoantikor olmayıp hastalık şiddeti ve bazı organ tutulumları ile ilişkileri olabileceği gösterilmiştir. Anti-enolaz antikorlar SLE ve Behçet hastalığıyla beraber sistemik skleroz ve mikst kriyoglobulinemide (MC) de gösterilmiştir. SLE ve MC'li grupta özellikle nefriti olanlarda pozitif saptanmıştır. Sklerodermalı hastalarda % 30 oranında bulunmuş ve interstisyel akciğer hastalığı ve anti-scl 70 antikor pozitifliğiyle ilişkili saptanmıştır (8,14). BH, tekrarlayıcı inflamatuvar reaksiyonla karakterize kronik multisistemik bir hastalıktır. Bu grupta yapılan çalışmalarda anti enolaz antikorlar %56 oranında pozitif saptanırken, özellikle vasküler tutulumu olanlarda yüksek oranda saptanmıştır (42-43). Japonya'dan yakın zamanda 80 intestinal Behçet hastalığına sahip hastada yapılan çalışmada anti-enolaz antikorlar %67.5 oranında pozitif saptanırken, sağlıklı kontrollerde % 0 oranında saptanmış ve intestinal tutulumun bir göstergesi olabileceği öne sürülmüş (44). Bizim çalışmamızda da anti-enolaz

antikorlar yüksek oranda pozitif (%68.8) saptanırken, organ tutulumlarıyla herhangi bir ilişki saptanmadı. BH'larımızın hiçbirinin intestinal ve vasküler tutulumları yoktu.

Anti-enolaz antikorlarının RA için düşük spesifitesi yanında, sitrüllinlenmiş  $\alpha$ -enolaz peptid 1 RA'lı hastalarda %37-62 oranında saptanmış ve %97 oranında özgüllüğe sahiptir. İnsan  $\alpha$ -enolaz ile bakteriyel enolaz %51 oranında aynı yapıya sahiptir ve CEP-1 bölgesinde bu benzerliğin %82 oranına çıktığı gözlenmiştir. 300'den fazla RA serumunda yapılan incelemede anti-CEP-1 antikor % 37 oranında saptanırken, sağlıklılarda %2 oranında ve hasta kontrol grubunda %3 oranında saptanmıştır. Anti-CCP pozitif hastaların yaklaşık yarısında sitriline enolaz peptid-1'e karşı antikor gösterilmiştir (11).

İsveç'te yapılan epidemiyolojik bir çalışma olan EIRA çalışmasında (1000 RA , 872 sağlıklı kontrol), anti-CEP1 pozitifliği %43 oranında bulunurken, İngiltere'den yapılan ayrı iki çalışmada %41 ve %27 oranlarında saptanmıştır. Her üç kohortta da anti-CEP1 pozitif olanların anti-CCP değerleri de pozitif saptanmıştır (21,37). Biz çalışmamızda sitrüllinlenmiş peptid antikorları ile oral mikroorganizmaların ilişkilerini araştırdık. Anti-CEP1 ile antiCCP korelasyonunu ve anti-CCP yüksek pozitiflik oranlarını gözönüne alarak öncelikli olarak anti-CCP otoantikor mikroorganizma ilişkilerini inceledik.

Son on yılda yapılan çalışmalara göre hasta ağız sağlığı ile genel sistemik hastalık arasında güçlü bir ilişki vardır. DM, inflamatuvar barsak hastalığı, kardiyovasküler hastalıklar ve romatoid artrit gibi hem prevalansı yüksek, hem de ilerleyici bir seyri olan hastalıklarda periodontal hastalıkla ilişki epidemiyolojik çalışmalarda da gösterilmiştir (12,14-15). Porphyromonas Gingivalis (P. Gingivalis), hafif periodontitten ilerleyici ağır peridontite kadar geniş spektrumda oral hastalığa sebep olan gram negatif bir bakteridir. Kronik periodontit (KP)'li olguların %80-90'ı P.Gingivalis etyolojik ajan olarak saptanırken, normal sağlıklı popülasyonda %10-30 oranında saptanmaktadır. Periodontit ise %8-60 sıklıkta bildirilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre %15 civarında ilerlemiş periodontitli erişkin hasta bulunmaktadır. KP'de her ne kadar bakteriler primer etyolojik ajanlar olarak bulunsada,

doku hasarı kronik inflamatuvar yanıtla ilişkilidir. P.Gingivalis, PAD enzimini ve bakteriyel enolazı eksprese eder. P.Gingivalis PAD'ın insan enolaz peptidlerini sitrülline ettiği gösterilmiştir (27,29,34). P.Gingivalis titrelerinin( $\geq 800$ ) ve P.Gingivalis'e karşı oluşan antikörlerin RA'lı hastalarda sağlıklı kontrol grubuna göre daha yüksek oranda olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada P.Gingivalis antikör titreleri, anti-CCP G2 ve CRP ile ilişkili bulunmuştur. Buna karşın RF alt tipleriyle herhangi bir ilişki saptanmamıştır (5). Bu çalışmadan farklı olarak; RF, gingiva, subgingival plak ve KP'li hastaların serumlarında gösterilmiştir. Lokal olarak üretilen RF'nin *Fusobacterium nucleatum* ve *Capnocytophaga achracea* isimli bakteri enfeksiyonlarıyla ilişkili olduğu bilinmektedir (30-32). Bizim çalışmamızda RA, BH ve SK gruplarında P. Gingivalis (4.4, 4.3, 5.01) ve T. Forsythensis (5.05, 4.6, 4.7) bakteri DNA ölçümleri log değerleri karşılaştırıldığında üç grup arasında fark saptanmadı ( $p > 0.05$ ). RA hastalarında anti-CCP, anti-enolaz, RF IgA ve RF IgM sonuçları ile oral bakteri analizleri arasında da herhangi bir ilişki gösteremedik. Sadece LogPG düzeyi ile ekstraartiküler tutulum arasında pozitif yönde korelasyon saptadık.

Kurato ve ark., beş periodontal patojenin (P.Gingivalis, T.Forsythensis, T.Denticola, Prevotella Intermedia ve Prevotella Nigrescens) tükürükteki miktarlarını periodontitli hastalarda oral sağlığı iyileştirici tedaviyi aldıktan sonra azalmış olarak saptamışlardır. Bu çalışmada bizim çalışmamızla benzer yöntemle PCR'la bakteri DNA tayini yapılmış ve total bakteriyel yük hesaplanmıştır. Bu çalışmada ortalama P.Gingivalis düzeyi 2.35 olarak saptanırken, ortalama T.Forsythensis düzeyi 0.41 olarak bulunmuş; bizim çalışmamızda ise P.Gingivalis düzeyi 4.41, T.Forsythensis düzeyi ise 5.05 olarak bulundu. Bizim çalışmamızın sonuçlarının yüksek olmasına hastaların altta RA hastalığının olması neden olmuş olabilir (45). Yine aynı çalışmaya ve daha önceki Awano ve ark., çalışmasına göre T.Forsythensis kronik periodontitli hastalarda RA hastalık şiddetiyle ilişkili bulunmuştur (46). Bizim çalışmamızda ise bakteri düzeyleriyle hastalık şiddeti arasında herhangi bir ilişki saptayamadık. Başka bir çalışmada ise, RA'lı hastaların serum örneklerinde P.Gingivalis'e,

P.intermedia'a, P. Melaninogenica'ya karşı antikorlar sağlıklı grup karşılaştırmasına göre daha yüksek oranda saptanmıştır (47). Biz çalışmamızda serumda direkt bakteriyel antikor düzeylerini çalışmadık.

Hastalığın kendisinin doğrudan etkisinin yanı sıra RA tedavisinde kullanılan ilaçlar da RA ile KP arasındaki olası ilişkide rol oynayabilir. RA tedavisinde kullanılan ilaçların birçoğu periodontidin ilerlemesini engelleyici yönde etki gösterir. Bizim hastalarımızın %39.7'si herhangi bir tedavi almayan, yeni tanı konan gruptu; %60.3'ü konvasiyonel DMARD tedavisine altındaydı. %46'sı metotreksat, %30.2'si salazoprin, % 25.4'ü hidroklorokin, %11.1'i leflunomid ve % 42.9'ü steroid kullanmaktaydı. İlaç tedavisi altında olan ve olmayan gruplar arasında bakteriyel analizler açısından fark saptanmadı. Pischon ve ark.ları hastalığın seyrini değiştiren ilaçlarla tedavi edilen RA hastalarında periodontit sıklığının daha az olduğunu bildirmişlerdir (48). Miranda ve ark., RA tedavisinin periodontal hastalık üzerindeki etkilerini 17 RA'lı hasta ile yaş, cinsiyet, periodontal durum ve sigara yönünden eşleştirilmiş sistemik sağlıklı bireylerde değerlendirmişlerdir. Periodontal enflamasyonu değerlendirmek amacıyla, klinik periodontal ölçümlerin yanı sıra dişeti oluğu sıvısında IL-1, IL-18 ve elastaz incelenmiştir. Çalışmaya dahil edilen hastaların % 88.2'si prednizolon, %76.5'i metotreksat, %76.5'i nonsteroid antiinflamatuvar ilaç, %23.5'i ise sulfasalazin kullanmakta olduğunu bildirmiştir (49).

RA'lı hastalarda el ve el bilek eklemlerindeki deformasyonlara bağlı olarak işlevlerin bozulması hastaların iyi ağız bakımı sağlamalarını güçleştirmekte ve mikrobiyal dental plak birikiminin artmasına neden olmaktadır. Fakat ağız bakımı uygulamalarının olumsuz yönde etkilenmesi RA ve peridontit arasındaki olası ilişkiyi tam olarak açıklayamamaktadır. Bıyıköglü ve ark., RA'lı hastalarla, periodontit hastalarını klinik ve immunolojik olarak değerlendirdikleri çalışmada gruplar arasında eksik diş sayısı bakımından fark olmadığını, buna karşın sondalanan cep derinliği ve dişeti iltihabının periodontitli hastalarda daha fazla olduğunu bildirmişlerdir.

Tüm bu verilere dayanarak, RA ve KP'nin ortak patolojik mekanizmaları paylaşan kronik inflamatuvar hastalıklar oldukları düşünülmektedir. Yapılan klinik ve epidemiyolojik araştırmaların çoğu iki hastalık arasında ilişki olduğunu desteklemektedir. Her iki hastalıkta da pro-inflamatuvar sitokinlerle anti-inflamatuvar sitokinler arasındaki dengenin bozulması sonucu doku yıkımı meydana gelmektedir. Ülkemizden ilk defa yapılan bu çalışmada, periodontal mikroorganizmalardan olan P.Gingivalis ve T. Forsythensis'in başta anti-CCP antikor olmak üzere anti- $\alpha$ -enolaz antikor, RFIgM ve RF IgA antikorlarıyla ilişkileri incelenmiştir. Anti- $\alpha$  enolaz antikor ve anti-CCP antikor pozitiflik oranları literatürle uyumlu saptanmakla beraber mikroorganizmalarla herhangi bir ilişkiye rastlamadık. Ancak coğrafyadan kaynaklanan farklı genetik özellikler ve düşük hasta sayımız daha önceki çalışmalarda gösterilen bazı ilişkilerin saptanmasını engellemiş olabilir. Farklı merkezler ve daha yüksek hasta sayıları ile yapılacak çalışmalar bu konulara netlik getirecektir.

Başlıca periodontal patojenlerden olan P.Gingivalis'in RA'da önemli rol oynadığı bilinen PAD enzimini salgılayabilen tek bakteri olması RA ve periodontal hastalık arasındaki ilişkiye farklı bir boyut kazandırmıştır. Periodontal tedavi sonrası RA aktivitesinde izlenen iyileşmenin P.Gingivalis'in ortamdaki uzaklaştırılması ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Klinikte, RA hastalarının periodontal tedavi gereksinimlerinin saptanması ve gerekli tedavilerin gerçekleştirilmesi, RA'nın klinik seyrini etkileyerek hastaların fonksiyonel durumlarının olumlu yönde değişimini sağlayabilir.

## **6. REFERANSLAR:**

1. Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH. Rheumatology textbook. Volume I.2010. 751-915.

2.EULAR online course. 2009-20011. Module 5: 1-52.

3. Avouac J, Gossec L, Dougados M. Diagnostic and predictive value of anti-cyclic citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: A systematic literature review. *Ann Rheum Dis* 2006;65:845-51.
4. Wegner N, Lundberg K, Kinloch A, Fisher B, Malmström V, Feldmann M, Venables PJ. Autoimmunity to specific citrullinated proteins gives the first clues to the etiology of rheumatoid arthritis. *Immunol Rev.* 2010 Jan;233(1):34-54.
5. Feng Liao, Zubing Li, Yining Wang, et al. Porphyromonas gingivalis may play an important role in the pathogenesis of periodontitis –associated rheumatoid arthritis. *Medical Hypotheses* 72(2009) 732-735.
6. Pancholi V. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cell Mol Life Sci.* 2001 Jun;58(7):902-20.
7. Terrier B, Degand N, Guilpain P, Servettaz A, Guillevin L. Alpha-enolase: a target of antibodies in infectious and autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 2007 Jan;6(3):176-82.
8. Federico Pratesi, Stefania Moscato, Alessandra Sabbatini, et al. Autoantibodies specific for alfa enolase in systemic autoimmune disorders *J Rheumatol* 2000; 27;109-15
9. Vincent Saulat, Olivier Vittecoq, Roland Charlionet, et al. Presence of autoantibodies to the glycolytic enzyme alfa enolase in sera from patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatism* 2002; 46:1196-1201.
10. Kinloch A, Tatzler V, Wait R, et al. Identification of citrullinated alpha-enolase as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005; 7(6): 1421-9.
11. Karin Lundberg, Andrew Kinloch, Benjamin Fisher, et al. Antibodies to citrullinated alfa-enolase peptide -1 are specific for rheumatoid arthritis and cross react with bacterial enolase *Arthritis Rheumatism* 2008;58:3009-3019
12. Marotte H, Farge P, Gaudin P, Alexandre C, et al. The association between periodontal disease and joint destruction in rheumatoid arthritis extends the link between the HLA-DR shared epitope and severity of bone destruction. *Ann Rheum Dis* 2006;65:905-909

13. Kula H, Salo T, Pirila E, et al. Local and systemic responses in matrix metalloproteinase 8-deficient mice during *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontitis. *Infect Immun* 2009;77:850-859
14. P.M. Bartold, R.I. Marshall, et al. Periodontitis and rheumatoid arthritis: A Review. *J Periodontol* 2005; 76: 2066-2074
15. Addie Dissick, Robert S Redman, Miata Jones, Gail S Kerr. Association of periodontitis with rheumatoid arthritis: A pilot study. *J Periodontol* 2009;81(2).
16. Bingham CO, Giles JT, et al. High prevalence of moderate to severe periodontal disease in rheumatoid arthritis patients ACR 2007;1017:249(poster).
17. Armitage GC. Diagnosis of periodontal diseases. *J Periodontol* 2003;74:1237-1247
18. Yaniv Mayer, Alexandra Balbir-Gurman, et al. Anti-TNF Alfa therapy and periodontal parameters in patients with rheumatoid arthritis. *J Periodontol* 2009;80:1414-1420.
19. Jacobsson LT, Knowler WC, Pillemer S, Hanson RL, Pettitt DJ, McCance DR, Bennett PH. A cross-sectional and longitudinal comparison of the Rome criteria for active rheumatoid arthritis (equivalent to the American College of Rheumatology 1958 criteria) and the American College of Rheumatology 1987 criteria for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1994 Oct;37(10):1479-86.
20. Funovits J, Aletaha D, Bykerk V, Combe B, Dougados M, Emery P, Felson D, Hawker G, Hazes JM, Huizinga T, Kay J, Kvien TK, Smolen JS, Symmons D, Tak PP, Silman A. The 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2010 Sep;69(9):1589-95.
21. Snir O, Widhe M, von Spee C, Lindberg J, Padyukov L, Lundberg K, Engström A, Venables PJ, Lundeberg J, Holmdahl R, Klareskog L, Malmström V. Multiple antibody reactivities to citrullinated antigens in sera from patients with rheumatoid arthritis: association with HLA-DRB1 alleles. *Ann Rheum Dis.* 2009 May;68(5):736-43.



22. Brennan FM, McInnes IB. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 2008 Nov;118(11):3537-45.
23. Cantaert T, De Rycke L, Bongartz T, Matteson EL, Tak PP, Nicholas AP, Baeten D. Citrullinated proteins in rheumatoid arthritis: crucial...but not sufficient! *Arthritis Rheum.* 2006 Nov;54(11):3381-9.
24. Aggarwal R, Liao K, Nair R, Ringold S, Costenbader KH. Anti-citrullinated peptide antibody assays and their role in the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009 Nov 15;61(11):1472-83.
25. Kinloch AJ, Lundberg KE, Moyes D, Venables PJ. Pathogenic role of antibodies to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Expert Rev Clin Immunol.* 2006 May;2(3):365-75.
26. Uysal H, Nandakumar KS, Kessel C, Haag S, Carlsen S, Burkhardt H, Holmdahl R. Antibodies to citrullinated proteins: molecular interactions and arthritogenicity. *Immunol Rev.* 2010 Jan;233(1):9-33.
27. Mangat P, Wegner N, Venables PJ, Potempa J. Bacterial and human peptidylarginine deiminases: targets for inhibiting the autoimmune response in rheumatoid arthritis? *Arthritis Res Ther.* 2010;12(3):209.
28. Snir O, Widhe M, Hermansson M, von Spee C, Lindberg J, Hensen S, Lundberg K, Engström A, Venables PJ, Toes RE, Holmdahl R, Klareskog L, Malmström V. Antibodies to several citrullinated antigens are enriched in the joints of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum.* 2010 Jan;62(1):44-52.
29. Smolik I, Robinson D, El-Gabalawy HS. Periodontitis and rheumatoid arthritis: epidemiologic, clinical, and immunologic associations. *Compend Contin Educ Dent.* 2009 May;30(4):188-90.
30. Mercado FB, Marshall RI, Bartold PM. Inter-relationships between rheumatoid arthritis and periodontal disease. A review. *J Clin Periodontol.* 2003 Sep;30(9):761-72.
31. Abou-Rya A, Abou-Rya S, et al. Periodontal disease and rheumatoid arthritis : Is there a link? *Scand J Rheumatol* 2005;34:408-410

32. Mercado F, Marshall RI, Klestov AC, Bartold PM. Is there a relationship between rheumatoid arthritis and periodontal disease? *J Clin Periodontol*. 2000 Apr;27(4):267-72.
33. Mineoka T, Awano S, Rikimaru T, Kurata H, Yoshida A, Ansai T, Takehara T. Site-specific development of periodontal disease is associated with increased levels of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* in subgingival plaque. *J Periodontol*. 2008 Apr;79(4):670-6.
34. Lundberg K, Wegner N, Yucel-Lindberg T, Venables PJ. Periodontitis in RA-the citrullinated enolase connection. *Nat Rev Rheumatol*. 2010 Dec;6(12):727-30.
34. Dissick A, Redman RS, Jones M, Rangan BV, Reimold A, Griffiths GR, Mikuls TR, Amdur RL, Richards JS, Kerr GS. Association of periodontitis with rheumatoid arthritis: a pilot study. *J Periodontol*. 2010 Feb;81(2):223-30.
35. Soory M. Periodontal diseases and rheumatoid arthritis: a coincident model for therapeutic intervention? *Curr Drug Metab*. 2007 Dec;8(8):750-7.
36. *Mod Rheumatol*. 2009;19(5):453-6. Rheumatoid arthritis is linked to oral bacteria: etiological association. Ogrendik M.
37. Mahdi H, Fisher BA, Källberg H, Plant D, Malmström V, Rönnelid J, Charles P, Ding B, Alfredsson L, Padyukov L, Symmons DP, Venables PJ, Klareskog L, Lundberg K. Specific interaction between genotype, smoking and autoimmunity to citrullinated alpha-enolase in the etiology of rheumatoid arthritis. *Nat Genet*. 2009 Dec;41(12):1319-24.
38. Wegner N, Wait R, Sroka A, Eick S, Nguyen KA, Lundberg K, Kinloch A, Culshaw S, Potempa J, Venables PJ. Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and  $\alpha$ -enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2010 Sep;62(9):2662-72.
39. Kinloch AJ, Alzabin S, Brintnell W, Wilson E, Barra L, Wegner N, Bell DA, Cairns E, Venables PJ. Immunization with *Porphyromonas gingivalis* enolase induces autoimmunity to mammalian  $\alpha$ -enolase and arthritis in DR4-IE-transgenic mice. *Arthritis Rheum*. 2011 Dec;63(12):3818-23.
40. Tunç R, Uluhan A, Melikoğlu M, Ozyazgan Y, Ozdoğan H, Yazici H. A reassessment of the International Study Group criteria for the diagnosis (classification) of Behçet's syndrome. *Clin Exp Rheumatol*. 2001 Sep-Oct;19(5 Suppl 24):S45-7.

41. Kinloch A, Lundberg K, Wait R, Wegner N, Lim NH, Zendman AJ, Saxne T, Malmström V, Venables PJ. Synovial fluid is a site of citrullination of autoantigens in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008 Aug;58(8):2287-95.
42. Lee KH, Chung HS, Kim HS, Oh SH. Human alpha-enolase from endothelial cells as a target antigen of anti-endothelial cell antibody in Behçet's disease. *Arthritis Rheum.* 2003 Jul;48(7):2025-35.
43. Lee JH, Cho SB, Bang D, Oh SH, Ahn KJ, Kim J, Park YB, Lee SK, Lee KH. Human anti-alpha-enolase antibody in sera from patients with Behçet's disease and rheumatologic disorders. *Clin Exp Rheumatol.* 2009 Mar-Apr;27(2 Suppl 53):S63-6.
44. Shin SJ, Kim BC, Kim TI, Lee SK, Lee KH, Kim WH. Anti-alpha-enolase antibody as a serologic marker and its correlation with disease severity in intestinal Behçet's disease. *Dig Dis Sci.* 2011 Mar;56(3):812-8.
45. Kurata H, Awano S, Yoshida A, Ansai T, Takehara T. The prevalence of periodontopathogenic bacteria in saliva is linked to periodontal health status and oral malodour. *J Med Microbiol.* 2008 May;57(Pt 5):636-42.
46. Awano S, Gohara K, Kurihara E, Ansai T, Takehara T. The relationship between the presence of periodontopathogenic bacteria in saliva and halitosis. *Int Dent J.* 2002 Jun;52 Suppl 3:212-6.
47. Ogrendik M, Kokino S, Ozdemir F, Bird PS, Hamlet S. Serum antibodies to oral anaerobic bacteria in patients with rheumatoid arthritis. *MedGenMed.* 2005 Jun 16;7(2):2.
48. Pischon N, Pischon T, Kröger J, Gülmez E, Kleber BM, Bernimoulin JP, Landau H, Brinkmann PG, Schlattmann P, Zernicke J, Buttgerit F, Detert J. Association among rheumatoid arthritis, oral hygiene, and periodontitis. *J Periodontol.* 2008 Jun;79(6):979-86.
49. Miranda LA, Islabão AG, Fischer RG, Figueredo CM, Oppermann RV, Gustafsson A.J. Decreased interleukin-1beta and elastase in the gingival crevicular fluid of individuals undergoing anti-inflammatory treatment for rheumatoid arthritis. *Periodontol.* 2007 Aug;78(8):1612-9.
50. Biyikoğlu B, Buduneli N, Kardeşler L, Aksu K, Pitkala M, Sorsa T. Gingival crevicular fluid MMP-8 and -13 and TIMP-1 levels in patients with rheumatoid arthritis and inflammatory periodontal disease. *J Periodontol.* 2009 Aug;80(8):1307-14.